

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАКУЛТЕТ ПО ДЕНТАЛНА МЕДИЦИНА, МУ-СОФИЯ
КАТЕДРА ПАРОДОНТОЛОГИЯ
Ръководител: Проф. Д-р Христина Лазарова Попова, дм.

Д-р Величка Теодосиева Досева - Панова

**БАКТЕРИАЛНА НАХОДКА И
ВЪЗПАЛИТЕЛНИ КОМПОНЕНТИ НА
ОТГОВОРА НА ОРГАНИЗМА ПРИ ТЕЖЪК
ХРОНИЧЕН ПАРОДОНТИТ**

Дисертационен труд

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност:

Терапевтична дентална медицина

Научен ръководител:

Проф. д-р Христина Лазарова Попова, дм.

София, 2018г.

Съдържание:

Въведение -	3
Литературен обзор -	5
Проблеми -	40
Цел и задачи на дисертационния труд -	42
Материали и методи на изследването -	43
1. Материали -	43
2. Методи -	45
Резултати -	53
По задача 1 -	53
По задача 2 -	56
По задача 3 -	83
По задача 4 -	92
По задача 5 -	102
По задача 6 -	109
Обсъждане -	111
По задача 1 -	111
По задача 2 -	116
По задача 3 -	126
По задача 4 -	132
По задача 5 -	135
По задача 6 -	138
Изводи -	146
Заклучение -	148
Приноси -	150
Списък на публикациите, участията в научни конгреси и проекти във връзка с дисертационния труд -	152
Книгопис -	154

Използвани съкращения:

Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Pg *Porphyromonas gingivalis*

Tf *Tannerella forsythia*

Td *Treponema denticola*

Pi *Prevotella intermedia*

Pm *Porphyromonas micros*

Fn *Fusobacterium nucleatum*

En *Eubacterium nodatum*

Cg *Capnocytophaga gingivalis*

Cr *Campilobacter rectus*

RANKL - receptor activator of Nuclear Factor kappa B ligand (*тип I мембранен протеин, експресиран по повърхността на остеокластите, остеобластите, T-клетките и дендритните клетки и улеснява имунния сигнал*)

IL-6 - interleukin-6 (*интерлевкин-6*)

IL-1 - interleukin-1 (*интерлевкин-1*)

TNF- α - tumor necrosis factor alpha (*тумор некротизиращ фактор алфа*)

LT- α - lymphotoxin alpha (*лимфотоксин алфа*)

IFN - interferon (*интерферон*)

CAL - clinical attachment loss (*загуба на аташман*)

BoP - bleeding on probing (*кървене при сондиране*)

PD - probing depth (*дълбочина на сондиране*)

BL - bone loss (*костна загуба*)

Ig A, Ig M, Ig G - immunoglobulins (*имуноглобулини A, G и M*)

SRP – scaling and root planing (*супра- и субгингивално инструментирание*)

ВЪВЕДЕНИЕ

Пародонталните заболявания са широко разпространени в целия свят, засягат индивиди във всяка възраст и са социално значими. Те представляват широк спектър хетерогенни състояния, вариращи в етиология, клинична експресия, прогресия и прогноза. Напредъкът в последните десетилетия в научните изследвания постигна значително изясняване на природата на различните пародонтални заболявания. Днес се знае, че повечето от тях са възпалително-деструктивни инфекции, свързани с повишени нива на патогенните агенти в денталния биофилм и са в значителна степен афектирани от възпалителния и имунен отговор на организма.

Гингивалните заболявания, свързани с бактериалната плака, са в голяма степен разбрани. Има достатъчно научни доказателства, подкрепящи бактериалната им етиология, съществува консенсус за диагностичните критерии и подходите на третиране и е известна тяхната реверзибилност.

Деструктивните пародонтални заболявания (пародонтити) в повечето случаи са резултат от екстензиране на възпалението от гингивата в подлежащия аташман и кост (хроничен пародонтит) с последваща прогресираща загуба на поддържащ пародонтален аташман.

Няма засега достатъчно ясни доказателства за факторите, въввлечени в прогресията на гингивитите в пародонтити, нито за тези, ангажирани с тежестта и прогресията на хроничните пародонтити. Научните изследвания фокусират върху присъствието и нивата на известни и още недоказани като пародонтопатогени бактерии в пародонталната среда и тяхната връзка с инициирането и прогресията на загубата на пародонтален аташман. Сложната микробиология на пародонтита, интербактериалните взаимоотношения и връзката им с отговора на организма са основния фокус на интерес в изучаване на бактериалната находка при хроничен пародонтит. Продължават опитите да се свържат отделни пародонтопатогени или комплекси от бактерии с различните форми на пародонтални заболявания, тежестта на заболяването и епизодите на прогресия. Необходими са проучвания върху определяне на ясни допълнителни диагностични критерии - микробиологични, биохимични и генетични, които едновременно с клиничните и рентгенографски измервания да служат на клиницистите в по-доброто разбиране и контрол на пародонталния статус на пациенти с хроничен пародонтит.

В съгласие със съвременната парадигма за инфекцията и отговора на организма интензивно се изучават и фактори, определящи характеристиките на деструктивния отговор на организма към патогенните бактерии. Има някои доказателства за генетично предопределена по-висока продукция на инфламаторни фактори от организма, въввлечени в деструкцията на съединителнотъканен аташман и кост, които обуславят и по-високата тежест и степента на прогресия на пародонтита. Установяването и използването на диагностични маркери, разкриващи чувствителността на организма към пародонтопатогените, генетично детерминирани или свързани със средата, може да обясни в голяма степен присъстващия хроничен пародонтит и неговата тежест, както и да предиктира резултатите от активната терапия, стабилност или прогресия при поддържането.

Оправдани са проучвания, които имат за цел детайлното познаване на бактериалната патогенна находка при хроничен пародонтит и характеристиките на отговора на организма и могат да рефлектират в създаване на клиничен и микробиологичен протокол на диагноза на пародонтита. Диагностичните микробиологични маркери могат да са полезни в планиране на терапията и реализиране на оценката на оздравяването, както и да предиктират прогресия.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Дефиниране на хроничния пародонтит

Хроничният пародонтит е възпалително-деструктивно заболяване на зъбодържачия апарат, асоциирано със специфичните пародонтопатогени от денталния биофилм. То води до загуба на поддържащи зъбите структури - алвеоларна кост и съединителна тъкан и засяга качеството на живот на индивидите – стига се до влошено хранене, загуба на зъби, социални и финансови проблеми. Има доказателства, че пародонталната инфекция е свързана и с някои системни заболявания. В този смисъл пародонталните заболявания представляват сериозен проблем на общото здраве. Широкото разпространение на хроничния пародонтит потвърждава неговата социална значимост.

Установено е, че хроничният пародонтит засяга до 80% от популацията на средна възраст; за сравнение данните за разпространението на агресивния пародонтит са до 1–1,5%. Приема се, че етиологията на това социално заболяване е мултифакторна, но доказателствата в литературата показват, че нивата на специфичните грам-отрицателни микроорганизми в субгингивалния плаков биофилм играят основна роля в инициацията и прогресията на заболяването. Измежду многобройните бактериални видове три вида – *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*), *Tannerella forsythia* (*Tf*) са здраво свързани с иницирането и прогресията на пародонтита като *Porphyromonas gingivalis* се смята за основен етиологичен агент. Понастоящем проучванията свързват здраво *Porphyromonas gingivalis* с хроничния пародонтит (35,65,77,83а,97,118,179).

Разбирането за развитието и прогресията на хроничния пародонтит предполага анализ на много фактори, свързани с микроорганизмите от бактериалния биофилм, от една страна, и от друга – фактори от организма и средата.

Знае се, че човешкият организъм е съставен от 100 000 милиарда клетки, от които 90% са бактерии (42). Микроорганизмите произлизат от обкръжаващата среда (вода, въздух, предмети) или от самия индивид, и могат да живеят в условия на равновесие. Средата на устната кухина се характеризира със своеобразната си комплексност и присъствие на различни микробни видове, паразити, микоплазми, гъбички, вируси. Оралните бактерии имат способността да формират биофилм по различни повърхности в устата: дентин, емайл, цемент, протези, ресторации, гингива.

Проучванията върху биофилмите в устната кухина показват, че могат да се разграничат биофилми с различна композиция и взаимовръзки на базата на тяхната локализация, микробен състав, метаболитна активност и патологичните промени в тъканите – пародонт, ендодонт, лигавица. Гингиводенталното пространство е ниша от устната кухина, която приютава бактериалната екосистема, към която е и най-големия интерес на изследователите. Средата се отличава с редица анатомични особености - твърда и мека стена, различни типове епител (на маргиналната гингива, сулкуларен, на аташмана, кератинизиран и некератинизиран), наличие на гингивална течност, която е трансудат (ексудат при възпаление) от капилярите на гингивата, преминаващ към устната кухина през гингиводенталната връзка. Микробната композиция, свързана с субгингивалния биофилм се отличава с по-малка плътност и по-малка адхезия в сравнение със супрагингивалната плака и е обект на интерес за диагностициране, лечение и проследяване хода на пародонталните заболявания. Екосистемата може да се наруши при определени обстоятелства като: прием на антибиотици, хранене, екстракции, отстраняване на зъбен камък, поставяне на протетични конструкции.

Съвременното становище за природата на пародонталните заболявания е повече от категорично и ги разглежда като бактериална инфекция с източник денталния биофилм или плака. Установено е, че някои от основните пародонтални патогени от субгингивалния биофилм притежават вирулентни възможности и се асоциират здраво с етиологията и патогенезата на пародонтита. Благодарение на продължаващите проучвания върху състава на субгингивалната микробиота днес се знае, че биофилмите са място-специфични, комплексни полимикробни общности, които проявяват резистентност към антимицробни агенти и защитата на макроорганизма. Обсъжда се ролята на редица рискови фактори, които повлияват хода, тежестта и прогресията на заболяването, податливостта и резистентността – системни или локални, променливи (тютюнопушене, стрес, диабет) или непроменливи (генетични).

2. Етиологични фактори в иницирането и прогресията на хроничния пародонтит

2.1. Основни пародонтопатогени

Изминали са повече от 300 години след като през 1683г. *Antonie Van Leeuwenhoek* с помощта на самоделен микроскоп е направил описание на орален микроорганизъм. Днес се знае, че около 750 микробни вида обитават устната кухина,

но малка група от тях са свързани с пародонтита. На базата на схващането, че пародонталното заболяване се „причинява от специфични бактерии или групи неспецифични бактерии” в продължение на десетилетия лечебните процедури при пациентите с пародонтит са с анти-инфекциозна насоченост. „Патогенът” се определя като агент (микроорганизъм – бактерия, протозоа, вирус), който причинява заболяване. „Коменсалът” е организъм, който участва в симбиотични взаимоотношения с представители на други бактериални видове, и дадения вид се ползва от това съжителство. Обаче тези определения са определено недостатъчни, за да се опише напълно адекватно хроничната полимикробна инфекция, каквато е пародонтитът. Обсъждат се широко условията, при които коменсал, асоцииран със здравето, може при дадени обстоятелства от обкръжаващата среда да се превърне в патоген и да причини и/или да се асоциира със заболяването. На базата на тези разсъждения и натрупаните научни познания, пародонталната микрофлора би могла да се разглежда като консорциум от коменсални видове.

Има доказателства в литературата, че микроорганизмите от субгингивалната зъбна плака са способни да иницират механизми на деструкция в пародонталните тъкани (2,66,140,147a,167).

Клинични изследвания показват, че техният ефективен и продължителен контрол е основно средство за стопиране прогресията на пародонталното заболяване. Някои грам-отрицателни бактерии са утвърдени като неизменно присъстващи в пародонталните лезии. Между тях са: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Spirochetes (Treponema denticola)*, *Capnocytophaga sp.* (2,41,64,66,77,97,140,175a,180).

Редица изследователи доказват, че присъствието в субгингивалния биофилм на *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia*, независимо дали поединично или в комбинация, увеличава риска за прогресия на пародонталното заболяване (64,77,127,140,180). Тези микроорганизми са били откривани по-рядко в плитки джобове (до 4мм), установено е количеството им да нараства в джобовете от 4 до 6 мм дълбочина, и да е значително при дълбочина на джоба над 6мм. За наличието на тези пародонтопатогени в плитки джобове дори се допуска, че е феномен на инфектиране от дълбоките пародонтални места (джобове).

Salari et al. (2004) установяват високи пропорции на анаеробните бактерии при пациентите с пародонтит, особено в по-дълбоките пародонтални джобове (139). Връзката между дълбочината на пародонталния джоб и микробната находка се обсъжда

в литературата. Има данни, че пародонтопатогените *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* се откриват по-често в дълбоките пародонтални джобове (>5мм) в сравнение с плитки (<4мм) (64).

Haffajee et al, 1998г., правят сравнително изследване при здрави лица и пациенти с пародонтит, което обхваща над 40 бактериални вида. Резултатите показват преобладаване на *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Selenomonas noxia* при пародонтално-засегнатите индивиди (64). Socransky et al. също съобщават за често съвместно присъствие на *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* в субгингивалната плака при пародонтит. Във връзка с този факт Socransky et al, 1998г. предлагат трите бактериални вида (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia*), които формират такава тясно асоциирана общност, да се обозначават с термина „червен комплекс”. На таблица 1 са представени най-тясно асоциираните с пародонталната деструкция пародонтопатогени (154). Данните от литературата показват, че класическите пародонтални патогени, каквито са тези от червения и оранжевия комплекси плюс *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, са главните микроорганизми, отговорни в патогенезата на пародонтита (3,35,64,66,77,93а,97). Доказателства за това идват и от факта, че намаляването на нивата и пропорциите им (в хода на лечението) е ефективно в контрола на прогресията на заболяването и води до продължителна стабилизация на пародонта. Добре известно е освен това, че комбинираният *scaling & root planning & системни антибиотици* имат голяма ефективност срещу патогенната орална микрофлора (9,41,85). Данни за това обаче, че този подход не е толкова ефективен в някои случаи внушава вероятност за присъствие на недобре идентифицирани все още като пародонтопатогени микробни видове (вируси, *Escherichia coli*, *Candida sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides sp.*). В някои случаи може да се стигне до свръхразвитието на такива видове и до персистиране на пародонталната деструкция (35).

В този смисъл допълнителните проучвания върху специфичните микробиологични профили на места с различна дълбочина на джоба при пародонтит биха били полезни в планирането на терапевтичните подходи и идентификацията на местата в риск от деструкция (41). От друга страна микробиологичен контрол след терапия може да идентифицира микробиологичната находка във връзка с добрия оздравителен отговор или рефрактерност. Характеризирането на субгингивалната микробиота след терапия би била валиден критерий за ефективността от провежданото

лечение. Продължителното поддържане на пациенти с пародонтит след терапия и предикцията на прогресията и рецидива при пациенти, лекувани от пародонтит биха били успешно осъществявани чрез мониториране на нивата на субгингивалните пародонтални патогени (35,41,64,97).

Таблица 1. Асоциирани микроорганизми с комплексите на Socransky (Socransky et al, 1998г.).

Комплекс	Патогенен щам
Аа-комплекс	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Червен комплекс	Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Tannerella forsythia
Оранжев комплекс	Prevotella intermedia, Peptostreptococcus(Micromonas) micros, Fusobacterium nucleatum
Оранжево-асоцииран комплекс	Eubacterium nodatum
Зелен комплекс	Capnocytophaga gingivalis

- Много силно патогенни – Аа комплекс
- Силно патогенни – червен комплекс
- Силно до умерено патогенни – оранжев и оранжево-асоцииран комплекси
- Умерено патогенни – зелен комплекс

Таблица 1 представя най-често свързаните с пародонталната деструкция пародонтопатогени. Socransky et al. съобщават за честа ко-детекция на *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* в субгингивалната плака при пародонтит. Освен това авторите внушават, че тези три бактериални вида формират тясно свързана група, наречена от тях с термина "червен комплекс". Авторите представят микроорганизмите в комплекси с различни цветове, определящи значимостта им в патологичния процес при пародонтит (157).

Грам-отрицателни анаероби (основно патогени от «червения комплекс») са основните етиологични фактори на хроничния и агресивния пародонтит и са добре характеризирани:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*Actinobacillus*) – G (-) малък пръчковиден капнофилен факултативен анаероб (малка, права или извита пръчица със заоблени краища). Притежава множество вирулентни фактори: ендотоксин, левкотоксин, колагеназа, протеаза, има способността на инвазира тъканите. Силно резистентен към конвенционалната механична пародонтална терапия.

Tannerella forsythia – непигментиран захаролитичен G(-)неподвижен пръчковиден облигатен анаероб (с предишни имена: *Bacteroides forsythus* и *Tannerella forsythensis*). Изолиран е от пародонтални джобове, тонзили, гърба на езика и слюнката на пациенти с пародонтит. Патогенност: протеолитични ензими, които водят до деструкция на имуноглобулините и факторите от системата на комплемента. Индуцира апоптоза и клетъчна смърт.

Основен представител на *Eikenella sp.* е *Eikenella corrodens*- коменсален капнофилен микроорганизъм, азахаролитичен, има данни, че участва в опортюнистичните инфекции при сепсис, абсцеси, перитонити, ендокардити и пародонтити.

Porphyromonas sp. (*Porphyromonas asaccharolytica*, *P. cangingivalis*, *P. canoris*, *P. cansulci*, *P. catoniae*, *P. circumdentaria*, *P. crevioricanis*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. gulae*, *P. levii*, *P. macacae*, *P. Salivosa*) са грам-отрицателни анаеробни пръчковидни бактерии, които произвеждат порфиринови пигменти (тъмно кафяв, черен).

Porphyromonas gingivalis - черно-пигментиран, неподвижен, азахаролитичен кокобацил, G(-) плеоморфен облигатен анаероб (формата му варира от коковиден до къса пръчка) и се асоциира значимо с пародонталните лезии и инфекции. По своите качества *Porphyromonas* са много близо до грам-положителните бактерии, и също както *Bacteroides sp.*, *Porphyromonas sp.* притежават вътрешна мембрана, пептидогликанен слой и цитоплазмена мембрана. Притежава много на брой вирулентни фактори, които му осигуряват преодоляването на защитата на организма и улесняват колонизацията му в устната кухина. Сред тях са: липополизахарид, полизахаридна капсула, фимбрии, хемаглутиници, екстрацелуларни протеолитични ензими (протеази, химиолизин, колагеназа) и адхезини, инхибира миграцията на полиморфонуклеарните левкоцити и влияе върху продукцията/деградацията на цитокините. Според някои изследователи *Porphyromonas gingivalis* може да има супресивен ефект върху отговора на организма при пародонтит. Сочи се за основен етиологичен агент при хроничния пародонтит, категоризира се като “агресивен” пародонтален патоген. Установено е присъствието му в 85.75% от субгингивалните плакови проби, взети от пациенти с хроничен пародонтит и рядко се открива при пациенти и в места без пародонтална деструкция. Редукцията в нивата на *Porphyromonas gingivalis* се свързва с контрол на заболяването и на пародонталното място (пародонтален джоб). Според съвременните проучвания нивото на този пародонтопатоген в проби от субгингивална плака може да служи за предикция

на прогресията на пародонталното заболяване в конкретните пародонтални места (джобове).

Treponema denticola – грам (-) спираловиден подвижен микроорганизъм. Продуцира протеолитични ензими, които могат да разрушават имуноглобулините (Ig A, Ig M, Ig G) и факторите на комплемента.

Род *Bacteroides* са грам (-) анаеробни бацили, подвижни или неподвижни. Към него се отнасят: *B. fragilis*, *B. forsythus*, *B. gracilis*, *B. oris*, *B. melaninogenicus* и др. *B. melaninogenicus* е преименуван като *Prevotella melaninogenica*.

Prevotella sp. включва редица анаеробни неподвижни бацили – от тях по-голямо внимание в литературата се обръща на ***Prevotella intermedia*** (познат като *Bacteroides intermedius*) - Грам-отрицателен облигатен анаероб (къса, със заоблени краища пръчка), който се среща при пародонталната инфекция, както при при гингивит, така и при пародонтит, а също и при некротичните пародонтални заболявания. Изолиран е при пациенти с дентоалвеоларни абсцеси и нома (cancrem oris). Произвежда протеолитични ензими, разглежда се като опортюнистичен патоген, свързан с пародонтита.

Fusobacterium nucleatum е Грам-отрицателен микроорганизъм, който се изолира от различни моно- и смесени инфекции при хора и животни. Той е ключов компонент на денталния биофилм при пародонталните заболявания заради способността си да коагрегира с други видове. По този начин играе роля на значим свързващ елемент между първичните и вторичните колонизатори при формирането на денталния биофилм. Индуцира апоптоза и клетъчна смърт на моноклеарните и полиморфонуклеарните клетки и влияе върху освобождаването на цитокини, еластаза и др. от левкоцитите. Данните от литературата свързват **F.n.** асоциираната пародонтална инфекция с преждевременното раждане при човека (preterm births).

Capnocytophaga gingivalis – дълги и тънки Грам-отрицателни пръчки, изолирани от устната кухина, коменсал, причиняващ опортюнистична инфекция. Свързва се с пародонталната инфекция и се открива в пародонтални джобове, при пациенти с понижен имунитет, а също и при много други заболявания: ендокардит, менингит, конюнктивит, перитонит, артрит, остеомиелит, бактеремия.

Campilobacter rectus е Грам-отрицателен микроаерофилен подвижен микроорганизъм, факултативен анаероб(-) (къса пръчка, с извита или хеликоидална форма). За него се смята, че е свързан с пародонталните заболявания и са установени положителни корелации с дълбочината на сондиране на пародонталния джоб,

кървенето при сондиране и възрастта на пациентите с пародонтит. Той също както *A. actinomycetemcomitans* произвежда левкотоксин, а също и протеолитични ензими.

Има данни и за свързани с пародонталните заболявания грам-положителни бактерии. *Peptostreptococcus sp.* са грам положителни облигатни анаероби. В усната кухина се съобщава да са откривани *P. magnus*, *P. micros*, *P. anaerobius*, *P. prevotii*. Между тях *P. Micros*, който притежава патогенни качества, които вероятно го свързват с инициирането на пародонталните лезии (колагеназа, хиалуронидаза).

Peptostreptococcus micros – Грам-положителен анаероб, с малка сферична клетка, поединично или в нишковидни групи, с бавен растеж. *Peptostreptococcus sp.* са коменсални микроорганизми в човешкото тяло и се срещат най-вече в усната кухина, кожата, гастроинтестиналния тракт, урогениталната система. Под действието на травматични или имunosупресивни фактори тези организми стават патогенни и дори септикемични. Участват в смесените анаеробни инфекции, включително абсцеси - мозъчни, на белите дробове, черния дроб, както и пародонтални.

Eubacterium nodatum – Грам-положителен орален микроорганизъм, свързан с деструктивното пародонтално заболяване. Установени са силни асоциации на *Eubacterium nodatum* и *Treponema denticola* с хроничния пародонтит, които се откриват в субгингивални проби независимо от присъствието или отсъствието на високи нива на строго асоциираните видове - Pg и Tf, за разлика от *Streptococcus oralis*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus intermedius* и *F. nucleatum ssp. vincentii*, които се асоциират със заболяването, когато *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* са представени в малки количества.

Таблица 2. Основни пародонтални патогени.

Бактериален вид	Асоциация	Елиминация	Имунен отговор	Вирулентни фактори
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	+++	+	+++	левкотоксин, инвазивност
<i>P. gingivalis</i>	+++	+++	++	протеолитичен, има капсула нарушава химиотаксиса
<i>P. intermedia</i>	++	+	+	протеолитичен
<i>B. forsythus</i>	++	+	+	протеолитичен
<i>T. denticola</i>	++	+++	+	подвижен, протеолитичен
<i>C. rectus</i>	++	+	?	левкотоксин, подвижен, инвазивност
<i>E. corrodens</i>	+	+	?	-
<i>P. micros</i>	+	+	+	протеолитичен
<i>F. nucleatum</i>	+	+	+	протеолитичен
<i>Selenomonas</i>	+	?	?	подвижен

Таблица 2 представя суспектните пародонтопатогени и тяхната асоциация с пародонталните заболявания, клиничен отговор към елиминация, имунен отговор и вирулентни фактори (68).

3. Обосновка на микробиологичните диагностични тестове при хроничния пародонтит

Необходимостта от микробиологичните тестове за диагностициране на различните форми и прогресията на пародонталните заболявания е доста обсъждана в литературата (2,66,67,126,134,152,154,162). Автори разглеждат микробната идентификация по-скоро в аспект на допълнително средство при терапевтичното планиране на пациентите с по-тежките пародонтални лезии и/или при лош отговор към проведеното лечение. В повечето публикации се касае за клинични ситуации, в които се цели избор на ефективна допълнителна антимикробна терапия, базирана на микробиологичните данни (67,162). Повечето статии в литературата, реферирани от Listgarten и Loomer, касаещи използването на микробиологичната идентификация в помощ на лечебния план при пациентите с пародонтит, са описания на клинични случаи (97). Само една публикация съдържа контролна група от 10 специалисти пародонтолози, които не използват микробиологични данни срещу 13 специалисти пародонтолози, които си служат с такива данни в рутинната си практика (94).

Проучването показва, че последните променят 69% от лечебните планове след получаването на микробиологичните резултати, пациентите им имат повече на брой посещения, повече процедури с scaling & root planing, 79% повече курса на лечение с антибиотични средства, и по-малко пародонтално хирургично лечение (94).

Използването на микробиологичните тестове за оценка на оздравяването или на прогресията на пародонталното заболяване се препоръчва от редица изследователи, в чиито разработки наличието или липсата на путативни пародонтални патогени се асоциира значимо с различния клиничен отговор на терапията (41,54,91,94,97,140,180).

Отсъствието на патогенни микроорганизми се приема за благоприятен предиктор на бъдеща стабилност на пародонталното заболяване, сравнено с присъствието им като предиктор на прогресия (41). Някои автори предполагат, че откриването на пародонталните патогени (Aa, Pg, Pi, Cr) над определени „критични” граници в поддържащата терапия показва увеличен риск от рецидив на заболяването (33,64). Chaves et al. 2000г. (33) установяват, че наличието на *P.gingivalis* е показателно за прогресията на пародонтита и костната загуба, а Tran et al, 2001г. (172), свързва присъствието на *Tannerella forsythia* със загубата на аташман при значима корелация (5,3 пъти повече в сравнение със случаите без откриване на T.f.).

В пародонталната наука има нужда от по-задълбочени изследвания, които да посочат връзката на определени микроорганизми с определени пародонтални заболявания. Целите на микробиологичния мониторинг са стратегически и могат да се дефинират като: подпомагане на диагнозата, таргетност в избора на терапия, контрол на лечебните резултати, оценка на риска и прогнозата.

3.1. Микробиологична диагностика

Известни са различни допълнителни методи, предлагани за по-точна диагноза и лечение на пародонталните заболявания, част от които са микробиологичните методики. Те са базирани на: анаеробното културелно изследване, видово-специфична серодиагностика, ДНК-ДНК хибридизация с видово-специфични ДНК проби, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) или polymerase chain reaction (PCR) (7,102,103,140,180,182). За два от ключовите патогенни бактериални вида (*Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia*), свързани с етиологията, патогенезата и прогресията на хроничния пародонтит, е установено, че не дават добър растеж при културелната техника (180,182). Loesche et al, 1990г. (101) сравняват ELISA,

имунофлуоресцентното изследване, ДНК-проби и културелни методи при детекцията на тези два микроорганизма и заключават, че ДНК-пробите и имунофлуоресцентният метод са значително по-убедителни и чувствителни в сравнение с културелната техника.

Най-много изучаваните и изследваните микроорганизми през последните години във връзка с пародонтита са: *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus* и спирохетите. Всички те се приемат за асоциирани и/или отговорни за загубата на аташман, преди всичко при агресивните пародонтити (158).

За целите на терапията и поддръжката е важно да се определи дали флората на джоба е съвместима или не с пародонталното здраве. **Микробиологичната диагноза цели потвърждаване на вида пародонтит, дефиниране на адаптирано лечение, обуславя вземане на правилно решение относно терапията, базирано на индивидуалната нужда на пациента и на засегнатото място (пародонтален джоб), допринася за избягване на бъдеща деструкция.** От друга страна откриването на присъствието на определени микроорганизми би позволило да се оцени еволюционния потенциал на пародонталната лезия (напр. *P. gingivalis*).

Със съвременните техники за ДНК и РНК хибридизация е възможно да се идентифицират голям брой бактериални видове. Техниката се използва за изследване на асоциациите между видовете в субгингивалната плака. Установява се връзка между някои бактериални видове, които формират група: *B. forsythus*, *T. denticola* и *P. gingivalis*. Друга свързана група бактерии включва *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *C. rectus* и *P. micros* (158). Има доказателства за осъществяването на коагрегация между *T. denticola* и *P. gingivalis*, която се асоциира с тежките форми на пародонталните заболявания (43).

Асоциирането на определени бактериални видове помежду им може да усилва тяхната вирулентност (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*) и да инициира процес на деструкция в пародонталните тъкани (152). **Затова анализът на субгингивалната флора в диагнозата и мониторинга на пародонталните заболявания може да предостави възможности за определяне на прогнозата на заболяването и за предикция на бъдещата деструкция.** Резултати от микробиологичните проучвания във връзка с иницирането и прогресията на пародонтита доказват категорично ролята на суспектните пародонтопатогени в

патогенезата на пародонталните заболявания, но не дават категоричен отговор на въпроса за специфичността на пародонталната инфекция.

3.2. Методи за вземане на микробиологични проби

Установено е, че информацията за микробиологичния анализ на плаката при пародонтит е зависима до голяма степен от техниката на вземане на пробата (103). Днес се обсъждат няколко важни пункта - селекция на пациентите за микробиологична диагноза, селекция на местата на вземане на проба, техниката на вземане на пробите. В литературата са описани два основни метода за събиране на субгингивална плака със стерилни приспособления: с помощта на кюрета или с ендодонтски книжен щифт. И двете техники изискват премахване на супрагингивалната зъбна плака, за да не се получи контаминация на пробата. В зависимост от естеството на микробиологичния тест пробите могат да се анализират веднага или да се поставят в транспортна среда и да се изпратят в лицензирани клинични лаборатории за анализиране. Някои учени смятат, че пробите, взети с кюрета, се различават от тези, взети с книжен щифт, защото с кюретата се събира плака от целия джоб, докато с щифта се събира плака от повърхностните слоеве на субгингивалния биофилм, които съдържат повече патогенна микрофлора (158). Вземането на проба с кюрета е по-агресивно за тъканите, може да доведе до кървене и до замърсяване с епителни клетки, остатъци от зъбен камък и кръв (32). Анализите от книжни щифтове съдържат по-високи пропорции патогенни бактерии в сравнение с пробите, взети с кюрета. Вземане на проби от субгингивален биофилм с щифт е значително по-успешно по отношение на събирането на плака от апикалната зона на джоба (134). Сензитивността на техниката на вземане на проби с книжен щифт се оценява на над 80% при детекцията на *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* и *P. intermedia* (41).

От голяма важност за микробиологичната диагноза е фактът, че всеки джоб има уникален микробиологичен профил и проба, взета от едно място може да не е представителна за флората от другите места и общо за пациента (103). Затова се препоръчва проби да се вземат от няколко пародонтални места (джоба) при един и същи пациент, което ще позволи да се получи по-достовверен статус на субгингивалната флора. Тъй като разпространението на микроорганизмите не е равномерно в устната кухина, Mombelli et al., 1991г. предлагат за търсенето на *P. gingivalis* да се оценяват 4 проби, взети от най- дълбоките места за всеки квадрант (115).

3.3. Микробиологичната идентификация може да стане чрез следните методи:

3.3.1. Бактериологична идентификация

Културелните методи се определят като “златен стандарт” на микробната идентификация. Те позволяват определянето на значителен брой бактерии, включително пародонтопатогени, чрез използването на селективни и неселективни среди. Културирането има уникалното предимство пред всички останали идентификационни методи да позволява определяне на бактериалната чувствителност към антимикробни агенти (изготвяне на антибиограма). Този метод е полезен за откриване на бактерии, които не се виждат на фазово-контрастен микроскоп - *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus*. Недостатъци на бактериологичния метод са: висока цена, продължителност на идентификацията (5-6 седмици), слаба чувствителност (10^4 - 10^5 за неселективни среди) - не може да открива ниските нива на микроорганизмите, при селективните среди чувствителността е малко по-висока (10^2 - 10^3), трудности да се култивират някои видове като спирохетите, зависимост от компетенцията на микробиолога (117). Освен това транспортната среда ограничава феномените на конкуренция и интербактериална инхибиция между анаероби и капнофили.

3.3.2. Микроскопска идентификация

За оценка на състава на плаката се използват тъмно-полевия и фазово-контрастния микроскопи. Чрез тези техники могат да се определят относителните пропорции на коковидните и филаментните микроорганизми в биофилма и така да се оцени патогенния му потенциал. Някои къси пръчковидни бактерии също могат да се наблюдават под микроскоп (*P. gingivalis*). Чрез микроскопската идентификация е възможно проследяването на промяната в състава на сугингивалната плака в хода на пародонталната терапия: от патогенна (плътна и доминирана от подвижни и пръчковидни видове) в бенефициална (рехавата и доминирана от коки и неподвижни видове). Доказано е, че подвижните видове са несъвместими с пародонталното здраве (99). Най-значителното предимство на микроскопското изследване е, че то може да се извършва непосредствено в кабинета и да показва ефективността на пародонталната терапия. Има и известна стойност в мотивацията на пациента. То обаче не помага за селекцията на антимикробен агент и е предназначено за микроорганизми, които са

подвижни и трудно се култивират (спирохети, подвижни пръчки, вибриони, фузобактерии).

3.3.3. Имунологична идентификация

Имунологичните методи идентифицират бактериите, използвайки моно- или поликлонални антитела срещу видово-специфични антигени. Към тях се отнасят: имунофлуоресцентната микроскопия, ензимно-свързани имунни тестове (ELISA), мембранни тестове, латекс коагулационни тестове. Имунните методи са бързи, много точни и до известна степен количествени. Те обаче не могат да служат за проследяване на антибиотичната чувствителност на микрофлората.

3.3.4. Имунофлуоресценция

Използването на маркирани антитела при имунофлуоресценцията е бърз метод, но показва лимитирана детекция от клетки и не намира приложение освен за скринингови тестове.

3.3.5. Ензимна идентификация

Протеолитичната активност на бактериите се смята за основен фактор в развитието на деструктивния процес при пародонтита. Loesche, 1986г. предлага бактериалната ензимна активност (BANA hydrolysis) да служи за маркер на протеолитичната активност (101). Този тест е положителен за *B. forsythus*, *T. denticola*, *P. gingivalis*. Разработени са тестове за директно измерване на ензимната активност в проби от пародонталния джоб. Търговски достъпни са: BANA тест за трипсин-подобен ензим, синтезиран от *B. forsythus*, *T. denticola*, *P. gingivalis*; хидролизира N- α -Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphthylamid до β -Naphthylamid (някои безвредни щамове *Carnocytophaga* и *Actinomyces* също дават положителна реакция). Подобен тест е Evalusite (Kodak) за разпознаване на *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* и *P. intermedia*.

3.3.6. Сонди на базата на нуклеинови киселини

Микробната идентификация се основава на търсене чрез ДНК сонди на уникалните последователности на нуклеиновите киселини в ДНК веригата, които са специфични за даден бактериален геном, вирус или паразит. Молекулата на ДНК е съставена от обединението на две вериги, всяка от които съдържа четири типа бази: гуанин, цитозин, аденин и тимин. Базите от едната верига се свързват по уникален начин с базите от другата верига чрез междинни хидрогенни връзки. Двойната спирала

на ДНК може да бъде подложена на денатурация чрез топлина или чрез алкализирание и да се получи разрушаване на хидрогенните връзки и двете вериги да се разделят. При определени физикохимични условия се получава реасоциация на веригите (хибридизация). Принципът на нуклеиновите сонди се състои в разделяне на двете вериги на ДНК на търсения бактерии и съединяването на базите от едната верига с базите от друга верига ДНК, маркирана с радиоактивен или нерадиоактивен елемент (сонда). Сондата се дефинира като последователност от нуклеинови киселини (най - малко 20 нуклеотида), хомоложни на друга последователност от ДНК или РНК, с която се хибридира чрез реасоциране на базите стабилно и специфично.

Търговски разпространени тестове са: PET test (MIP Pharma) GmgH; Parogene™, Strasbourg; DMX Pathotek™, Zurich; Sixou™, Toulouse; IAI Padotest4-5, Zuchwil.

Предимствата на молекулярния метод са: максимална специфичност, висока чувствителност (10^{-3} - 10^{-4}), бързина (24-48 часа), не се работи с живи бактерии. ДНК и РНК сондите са технологии, които не са зависими от точно определени условия на транспортната среда. Отчитането на резултатите от анализа се прави автоматично или се обективизира чрез положителен тест, без да се интерпретира от микробиолог. Като недостатъци се сочат прицелното търсене на определени микроорганизми и невъзможността да се направи антибиограма.

3.3.7. Типове сонди:

- Глобални маркирани геномни сонди.

Сондата е макромолекула, която има зони със специфични таргетни микроорганизми и зони с неспецифичен състав, които се получават след редица реакции на кръстосана хибридизация;

- Къса сонда: различава се по размера (броя на чифтните бази) - 3 до 6 килобази, което се смята за най- подходящ размер за протичане на добра хибридизация за селектиране на специфичната последователност на даден микроорганизъм;
- Сонди за диагностициране на еукариотни клетки;
- РНК сонди: те се използват широко в бактериалната таксономия и идентификация. Първите опити за получаване на рибозомни последователности са през 1985 година.
- Синтезирани олигосонди: къси последователности от ДНК, получени *in vitro* - отличават се със слаба чувствителност, което налага допълнителни хибридизации.

3.4. Интерпретация на микробиологичната диагноза при пародонтални заболявания.

В литературата са описани редица изследвания, които доказват асоциация между някои бактериални видове и клинични параметри на пародонталното заболяване (41,101,158).

Много учени се опитват да дефинират определени пародонтопатогени като предиктори или индикатори на пародонталната деструкция. Литературни данни показват, че идентифицирането на *P. gingivalis* строго корелира с увеличената дълбочина на джоба при сондиране, в по-малка степен корелира със загубата на аташман и кървенето при сондиране, и не корелира с плаковите индекси (41). *A. Actinomycetemcomitans* корелира с увеличената дълбочина на джоба, загубата на аташман, гингивалното възпаление и кървенето при сондиране. Slots, 1986г. изследва загубата на кост и аташман за период от 2 до 5 години при пациенти с пародонтит и установява строга корелация на *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* и *P. intermedia* с места, показващи прогресия на загуба на аташман и кост (152). Haffajee, 1991г. идентифицира чрез ДНК сонди 14 бактериални вида при 38 пациента в опит да предиктира бъдеща загуба на аташман. Той открива *P. gingivalis* в много високи количества при пациентите в активна фаза на пародонталното заболяване (68).

Съвременни публикации посочват, че **идентифицирането от пародонталния джоб на *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *T. denticola*, *P. gingivalis* се приема за рисков фактор за очакван лош отговор към бъдещото конвенционално лечение** (175,182). При *A. Actinomicetemcomitans* $>10^4$ и *P. gingivalis* $>10^5$ значително се увеличава риска за прогресия на даденото пародонтално място (117).

Наличието на тези пародонтопатогени се асоциира с тежък хроничен пародонтит, агресивен пародонтит или с рецидив на болестта. **Чрез таргетното търсене на посочените микроорганизми може да се определят рисковите пациенти и рисковите места за пародонтална деструкция и загуба на аташман.** Някои учени предлагат при определяне състава на субгингивалната плака да се тълкува освен присъствието на патогенните микроорганизми, и отсъствието на протективни микроорганизми (някои стрептококи), които са необходими за пародонталното здраве, защото са антагонисти на патогенните бактерии (101).

Според епидемиологичните проучвания тежките и агресивните пародонтити засягат относително малък дял от популацията. **Съвременната пародонтологична диагноза изисква ранно откриване на индивидите и местата с бързо протичаща**

загуба на пародонтални тъкани. Възможно е идентифицирането на рисковите групи и индивиди да става с микробиологична диагностика на определени бактериални видове: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia* (153).

3.5. Значимост на микробиологичната диагноза в дефиниране на терапията

Съвременни проучвания документират факта, че нехирургичната пародонтална терапия има възможностите да редуцира тоталния субгингивален бактериален товар, както и да променя композицията на патогенната микрофлора (28). Установено е, че отстраняването на зъбния камък и плаката, и инструментирането на кореновите повърхности (scaling & root planing) е ефективно спрямо бактериите от червения комплекс, докато останалата бактериална флора остава стабилна (63,157). Все пак *A. actinomycetemcomitans* показва голяма резистентност към механичното отстраняване и може да се елиминира с комбинация от механични и/или хирургични процедури и администрация на антимикробни агенти. Установяването на дадени микроорганизми чрез анализа може да помогне при таргетното назначаване на системните антимикробни средства (175). Днес е прието употребата на антибиотик в пародонталната терапия да става след микробиологична диагностика и антибиограма (103).

Микробиологичният мониторинг на субгингивалната анаеробна флора допринася за по-доброто разбиране на същността на пародонталните заболявания. Микробиологичният анализ на субгингивалния бактериален биофилм е от голяма полза за диагнозата, лечението, прогнозата, в реценката и контролирането на резултатите. Усилията на съвременната микробиологична пародонтална диагноза имат за цел да се даде отговор на въпроса дали специфични микроорганизми са отговорни за специфични форми на пародонталните заболявания. Микробиологичните тестове имат висока диагностична стойност при пациентите с тежък хроничен пародонтит, с агресивен пародонтит, с рефрактерен пародонтит (които не отговарят адекватно на прилаганото конвенционално лечение).

4. Орална бактериална флора във връзка с хроничния пародонтит

Пародонтитите са група мултифакторни възпалителни заболявания, които водят до деструкция на поддържащите зъбите структури. Роля в патологичния процес играе нарушени баланс между патогенната орална микрофлора, имунната система на макроорганизма и факторите на обкръжаващата среда. Хроничният пародонтит е заболяване, при което зъбите от дентицията са засегнати от хоризонтална или вертикална загуба на поддържаща кост, която се открива при задължителното присъствие в пародонталната лезия на високи нива на анаеробни микроорганизми, главно грам-отрицателни, и спирохети. В съвременната литература е прието становището за основната етиологична роля на патогенните бактерии от денталния биофилм. До голяма степен развитието и прогресирането на заболяването са свързани с критичното колонизиране на субгингивалното пространство от пародонтопатогенни микроорганизми като: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Capnocytophaga spp.* Понякои данни сочат, че между някои от тях е установено формирането на видово специфични комплекси със строги асоциации, което потенцира тяхната патогенност (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, и *Treponema denticola*) (3,27,77,103,157,170,180).

4.1. Присъствие на суспектни пародонтални патогени при хроничен пародонтит

Проучванията са показали, че от многото бактериални видове в оралната среда най-голяма значимост за пародонталните заболявания имат грам-отрицателните бактерии от денталния биофилм. По-голямата част от тях са облигатни анаероби, неподвижни и се отнасят към родовете: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*. По-малка част са подвижните Грам(-) бактерии: *Selenomonas*, *Centipeda*, *Campylobacter*. Някои Грам (-) бацили могат да съжителстват с облигатните анаероби, но в същото време притежават и капнофилен тип метаболизъм, т.е. по-толерантни са спрямо кислорода, като например *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*.

Грам-отрицателните коки, намиращи се в устната кухина, са най-често представители на *Neisseria* и *Veillonella*. В литературата има данни, че те са откривани по повърхността на оралната лигавица (бузи, устни, език), супра- и субгингивалната плака, както и в слюнката. На тези видове не се отдава патогенна роля, въпреки честата

им находка едновременно с присъствието на пародонталните заболявания. Те обаче се приемат като фактори в първичната колонизация на пеликулата при формирането на денталния биофилм.

Грам-отрицателните бацили са представители на видовете: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*.
(Разгледани подробно в предните дялове на литературния обзор)

Streptococcus sp. често присъстват в изолати от устната кухина. За някои от тях се смята, че играят съществена роля заради синтеза на екстрацелуларни полизахариди (декстри, левани) и участват в състава на зъбната плака и в нейния метаболизъм. Повече са проучвани: *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*.

В оралната следа присъстват и грам-положителни бацили и филаменти: *Actinomyces sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Eubacterium sp.*, *Corynebacterium sp.* Тяхната роля е изучавана предимно във връзка с етиологията на зъбния кариес, в това число и радикуларния кариес, но отношението им към пародонталните заболявания засега е неясно.

Научните разработки показват, че пародонталното пространство може да бъде колонизирано не само от утвърдените като пародонтални патогени микроорганизми, но също и от други видове, чието участие в етиологията и патогенезата на пародонтита не е проучено достатъчно. Като такива недоказани пародонтопатогени се посочват някои вируси – цитомегаловирус, вирус на Ебщайн-бар, *Escherichia coli*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides* (1,3,82,103). Освен значимите доказани пародонтални патогени автори откриват повишени количества и на други микроорганизми, за чието присъствие и значимост в пародонталната среда няма категорични данни: *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, и *Aspergillus fumigatus* (84).

Съвременното разбиране на инфекциозната природа на пародонталните заболявания обосновава антимикробната механична терапия, която при голямата част от пациентите с хроничен пародонтит е успешна. Елиминирането на патогенните видове от субгингивалната среда и контрола на бактериалния товар води до оздравяване в пародонталните тъкани и стабилизиране на нивата на пародонтална поддръжка. Има данни обаче, че някои пародонтопатогени са в по-голяма степен резистентни на механичното третиране на джоба и трудно се елиминират (напр. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*). Вероятно поради този факт според Jenkinson и Douglas приблизително 10% от пациентите с хроничен пародонтит показват

продължаваща загуба на епително прикрепване независимо от приложената пародонтална терапия (82).

В подобни рефрактерни пародонтални случаи често се откриват присъствие и повишени нива на анаеробни микроорганизми със здрава връзка с пародонталната лезия, но и също така стафилококи и *C. albicans*. Неуспехът на пародонталното лечение в тези случаи би могъл да се обясни с по-трудния достъп до патогенните бактерии в хода на механичната терапия. Има данни, че определени микроорганизми притежават способност да инвазират гингивалните тъкани или да навлизат и се ретинират в неравности на кореновите структури и така да реколонизират субгингивално (31,82,142,174).

Персистирането на микробни видове, неидентифицирани досега като пародонтопатогени, би могло също да е обяснение на лош отговор към конвенционалната терапия. Субгингивалното пародонтално пространство (пародонталният джоб) представлява благоприятна екологична ниша за много микроорганизми, които са нормални обитатели на устната кухина, но и които биха могли при дадени обстоятелства да реагират като опортюнистични патогени. Способността на *Staphylococcus spp* и *Candida spp* да формират биофилм и да живеят в рамките на разнообразни като условия ниши (аеробни и/или анаеробни) им позволява да развият различни механизми за увеличаване на резистентността им: преодоляване на защитните бариери на организма, резистентност към антимикробни агенти и участие в механизмите на суперинфекции (37). Не е изяснена засега ролята на някои микробни видове, които присъстват в пародонталната среда, по отношение на иницирането и поддържането на пародонталната деструкция (59a). Още повече, че видове като *C. albicans* се изолират най-често от местата със смесени инфекции заедно с орални стрептококи, *Peptostreptococcus micros* и *Fusobacterium nucleatum*, често идентифицирани при персистиращите ендодонтски лезии. Има предположения обаче, че тези микроорганизми, откривани в комбинирани едnodонтско-пародонтални лезии и фуракационни увреждания, могат да са въввлечени в патогенезата на пародонталното заболяване (82).

4.2. Присъствието на *Candida* -инфекция при пародонтит

Тъй като микроорганизмите съществуват обикновено в полимикробни комплекси в денталния биофилм, способността на дрождите да съществуват заедно с

коменсални или патогенни бактерии, се оценява като важен вирулентен фактор. Качествените и количествени характеристики на съжителстващите микроорганизми също така биха могли да влияят върху формирането на *Candida* – биофилма. Thein et al. проследяват ефекта от оралните бактерии, включително пародонтопатогените: *Prevotella nigrescens* и *Porphyromonas gingivalis*, върху развитието на *Candida* – биофилма *in vitro* и наблюдават промени в него, които обясняват с влиянието на метаболитните продукти на анаеробите върху растежа на биофилма. Авторите обръщат внимание на необходимостта да се изследват смесените биофилми с оглед оценката на ефективността на антимикотичните средства. Установена е способността на *Candida* да взаимодейства със стрептококи, актиномицети, и фузобактерии при формирането на комплексните бактериални общности, както и се предполага, че е възможно *C. albicans* да се асоциира с *P. gingivalis* и *T. denticola* при пародонтит и с *F. nucleatum* при гингивит (82).

Като фактори на риска за кандиданосителство се посочват: женският пол (66%) и носенето на подвижни протези (43,5%), а предразполагащите фактори са: възрастта, хранителен дефицит, химиотерапия, хормонална терапия, лечение с антибиотици, намалено слюноотделяне, ниско РН на слюнката, повишена концентрация на глюкоза в слюнката, тютюнопушене, което кореспондира със схващанията и на други автори в съвременната литература (5,10,81,106).

Candida spp. са откривани на разнообразни места при пациенти с пародонтит: устната кухина, устната лигавица, храносмилателния тракт и фаринкса. За най-честа локализация на *C. albicans* в устната кухина се посочва дорзалната повърхност на езика (5). Въпреки това понастоящем корелацията между присъствието на *Candida spp.* и тяхната патогенна способност по отношение на пародонталното заболяване не е ясно дефинирана.

Въпреки, че букалната лигавица се счита за основен резервоар на *Candida spp.*, за тези микроорганизми е установено, че са способни да „ко-агрегират” с бактериите от субгингивалния дентален биофилм и в този смисъл е уместно да се разглеждат като значим фактор при процеса на колонизация на пародонталните джобове. Знае се, че *Candida albicans* притежава редица вирулентни качества като: протеолитична активност и способност да адхерира към епитела, както и да го инвазира. Установено е, че в самото начало на патологичния процес играят роля именно тези ключови характеристики на *Candida spp.* – способността за адхезия към епитела и за инвазиране в гингивалната съединителна тъкан, т.е. проявата на т.нар. диморфизъм, както и

формирането на хифи в епитела и съединителната тъкан. В допълнение на това непременно трябва да се спомене, че *Candida spp.* могат да подтискат функцията на полиморфонуклеарните неутрофили (действат като инхибитори на фагоцитозата), също така да продуцират колагенази и протеинази (aspartyl proteinase, phospholipase) – ензими, отговорни за разграждането на имуноглобулините и протеините от екстрацелуларния матрикс. Познатите вирулентни фактори на *Candida spp.*, асоциирани и отнесени към податливостта на макроорганизма биха могли да играят роля в индуцирането на възпалителните реакции и алтерации при по-тежките пародонтални заболявания (80,106,128).

Candida albicans представлява диплоидна гъбичка, която расте под формата на дрожди и нишковидни клетки, и е главен причинител на опортюнистичните орални и генитални инфекции при хората. *C. albicans* е коменсален микроорганизъм, който обитава устната кухина и гастроинтестиналния тракт. Съобщава се, че при 80% от човешката популация свръхрастеж на *Candida albicans* не води до сериозни нарушения в общото здраве. Въпреки това системните кандидози са сред основните фактори във вътре-болничните инфекции и важни причини за заболяемостта и смъртността при имунокомпрометираните пациенти (HIV-инфектирани, болни от СПИН, болни на химиотерапия и на имunosупресивна терапия след органна и костна трансплантация). Увеличени нива на *Candida* могат да се наблюдават и при някои не-имуносупресирани пациенти – напр. има данни за по-голяма честота при хора с пиърсинг или различни видове дентални протези в устната кухина.

Освен *Candida albicans* са познати и други геномни последователности: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae*, *Candida crusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii* (5,82).

Прегледът на съвременната литература показва, че ролята на микотичната инфекция в етиологията и патогенезата на пародонталните заболявания не е добре изяснена. Известни са едва няколко клинични контролирани проучвания за наличието гъбичките в устната кухина при пациенти с пародонтит. Представители на *Candida spp.* са изолирани от пародонтални джобове при сравнително ограничен брой изследвания: Hannula et al. установяват *Candida albicans* в приблизително 14% до 19% от пациентите с пародонтит (70); Reynaud et al. откриват също *Candida albicans* в 19,7% от изследваните индивиди с пародонтални джобове, по-дълбоки от 7мм и в 15,6% при умерено дълбоките пародонтални места (4 до 7мм) (136).

Изследването на Cuesta et al. цели да открие присъствието на *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.* в биофилм от субгингивална плака и оралната среда на пациенти с гингивални и пародонтални заболявания (37). То обхваща 82 индивида с пародонтално заболяване с поне две места с дълбочина на джоба над 3мм. Субгингивалните плакови проби са взети с Грейси кюрета, а пробата от оралната лигавица (букална лигавица, гърба на езика) – със стерилен памучен тампон. Резултатите показват, че при 25.6% от пациентите се установява присъствие на *Candida spp* в пародонтален джоб и 42.7% - в устната кухина. *Candida albicans* е установен като доминиращ микотичен представител и в двете изследвани области – пародонтален джоб (76.2%) и устна кухина (63.0%) (37). Javed et al., 2009г. съобщават, че оралната микотична колонизация е значително по-висока при жените в сравнение с мъжете, но такава зависимост все още подлежи на дискусия (81). Други проучвания също показват, че *C. albicans* може да колонизира пародонтални джобове и се асоциира действително значимо с възпалението на оралната лигавица при жените с пародонтит (10,141). Според Brusca et al., 2010г. при жените, употребяващи орални контрацептиви, се констатира повишени нива на пародонталните патогени: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, и *A. actinomycetemcomitans*, и по-специално *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, и *C. glabrata*. (29). Sardi et al. 2011г. изследват присъствието на пародонталните патогени: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia*, и четири различни вида *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* и *C. tropicalis*) в пародонтални джобове и засегнати фуркации при диабет II тип и при лица без диабет с тежък хроничен пародонтит. Те установяват наличие в по-високи количества на *Candida spp.* и по-специално - *C. dubliniensis* и *C. albicans*, и по-ниски – на *T. forsythia* при пациентите с диабет в сравнение с пациентите без диабет. (142). Bastos et al. намират асоциация между честотата на *C. albicans* ($P = 0.056$), *P. gingivalis* ($P = 0.008$), *T. denticola* ($P = 0.013$) и загубата на епително прикрепване при пациенти с хронични бъбречни заболявания. (22). Masako et al., 2003г. провеждат изследване с цел да се определи честотата на присъствие на *Candida spp.* в пародонтални джобове на пациенти с хроничен пародонтит чрез едновременно прилагане на polymerase chain reaction (PCR) и културелен методи. При 100 пациента са вземани проби от пародонтални джобове и от оралната мукоза (съответно със стерилен книжен щифт и със стерилен памучен тампон). Те откриват *Candida spp.* в 68% от пробите от орална лигавица и в 4% от пробите от пародонтални джобове. Това е в съгласие с данните, получени от други проучвания, при които честотата на срещане на

Candida spp. в пародонталното пространство е в границите 2-2,5 % (109). Brusca, et al. (2010) установяват значима асоциация между вида *Candida* и пародонтита само за *C. Parapsilosis* (29), докато Järvensivu et al. (2004) внушават, че *C. albicans* може би играе роля в структурата и адхерирането на субгингивалния дентален биофилм поради наблюдаваната от тях значителна пенетрация на хифите в сулкуларния епител и в подлежащата гингивална съединителна тъкан (80). В най-новото, открито от нас при събирането на литературните данни, проучване на Canabarro et al. от 2012г., авторите се опитват да интерпретират и връзката между субгингивалната колонизация с *C. albicans* и други дрожди с тежестта на хроничния пародонтит, и установяват такава зависимост (30). Има данни, че присъствието на кандидата в микробната находка на пародонталния джоб обуславя дефицит на представителите на съвместимата с пародонталното здраве микрофлора, и преобладаването на кандидата-асоциирана микрофлора и намалена антимикуробна чувствителност на патогенните микроорганизми. Това схващане би обяснило защо дори и при стриктно спазване на протокола за антимикуробна терапия при заболяванията на пародонта, в някои случаи постигнатите резултати могат да са недостатъчни и да не са дълготрайни, и традиционните схеми на лечение да се оказват неефективни. В някои случаи може да се стигне до свръхразвитието на някои видове и до персистиране и прогресия на пародонталната деструкция (35). В този смисъл допълнителните проучвания върху специфичните микробиологични профили на места с голяма дълбочина на джоба при пародонтит биха били полезни в идентификацията на местата в риск от деструкция и планирането на терапевтичните подходи (41).

Наличните досега проучвания показват, че присъствието на *Candida spp.* в пародонталните джобове само по себе си може да не е свързано с развитието на пародонтит, нито дори с участие в прогресията и тежестта на лезията. Остава неизяснено дали микотичната инфекция допринася за тежестта на заболяването или дали показва някаква специфичност за хроничната или агресивната форма на пародонтита. Така например Urzúa et al. наблюдават, че *C. albicans* и *C. dubliniensis* са способни да колонизират пародонталните джобове при пациенти с хроничен пародонтит, докато само *C. albicans* е открита в субгингивалната микрофлора при здрави индивиди и пациенти с агресивен пародонтит (174). От друга страна е необходимо определянето на фактори, свързани с организма и характеристики на пародонталната среда, които биха имали отношение към към тежестта и прогресията на пародонтита, а също и към субгингивалната колонизация на *C. albicans*.

5. Характеристики на отговора на организма във връзка с инициирането и прогресията на хроничния пародонтит

5.1. Проинфламаторните цитокини във връзка с деструктивните процеси при хроничен пародонтит

Пародонталните патогени, присъстващи в повишено количество в супрагингивалния биофилм и субгингивалното пространство, имат способността да предизвикват активиране на защитните механизми на организма и на имунната система. В последните десетилетия е установен фактът, че възпалителният отговор на организма срещу бактериите и техните вирулентни фактори е в основата на разбирането за патогенезата на хроничния пародонтит (17,62,100,108,113a,127,167,184).

Деструктивният отговор на организма се свързва с извънредно повишената продукция на инфламаторни цитокини в тъканите (100,113a,127,138,149,164b,167). Показано е, че гингивалните тъкани и гингивалната течност при пациенти с хроничен пародонтит съдържат значително количество RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand), проинфламаторни цитокини като интерлевкините 1 и 6, тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF- α), химиокини като интерлевкин 8 и други медиатори на възпалението в сравнение с тези при здрави индивиди (86a,100). Повишената експресия на тези продукти в тъканите в отговор на бактериите от субгингивалното пространство е основен фактор на алвеоларната костна резорбция и загуба на съединителна тъкан при хроничния пародонтит (34a,127,167).

Цитокините са голяма група малки протеини с определени възможности за биологична активност, чиято главна функция е регулиране на отговора на организма при пародонтит. Групата включва интерлевкини, интерферони и семейството на тумор-некротизиращия фактор (Tumor necrosis factor). Химиокините оформят отделна група с активност, подобна на интерлевкините. Известни са 35 интерлевкина като в таблица 3 и таблица 4 са разгледани основните активности на ключовите за пародонталната деструкция цитокини.

Таблица 3. Основни групи цитокини (Taylor, 2010).

Група цитокини	Функция	Медиатори
Про-инфламаторни цитокини	Първичен имунен отговор и активиране на възпалението	IL-1, TNF-alpha, IL-12, IL-23, IL-32
glycoprotein130 сигнални цитокини	Диференциране и растеж на левкоцитите, acute-phase реакции	IL-6, IL-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M
Т-клетъчни регулатори	Баланс на Т-клетките, регулация на придобития имунитет, повлияване на инфламаторния отговор	IFN gama, IL-12, IL-15, IL-18, IL-6, IL-17, IL-23, IL-4, IL-5, transforming growth factor-beta и др.
Анти-инфламаторни	Down-регулация на имунния отговор и възпалението	transforming growth factor-beta, IL-10, IL-13
Химиокини	Активиране на неутрофилния химиотаксис	IL-8 и др.
Тип 1 интерферон	Антивирусен имунен отговор	IFN-alpha, IFN-beta
Активатори на костните клетки	Развитие и функция на костните клетки	RANKL
Растежни фактори	Регулиране на тъканната функция, фиброза, репарация	transforming growth factor-beta, vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, epidermal growth factor, fibroblast growth factor
Стимулиращи колонизирането фактори	Хемопоеза, локализирана диференциация на имунните клетки	IL-3, IL-7 и др.
Адипокини	Метаболитна регулация, имунна регулация	IL-6, leptin, adiponectin, visfatin

Таблица 4. Ефекти на по-значимите за пародонталните заболявания цитокини (Liu et al. 2010).

Цитокини	Костна резорбция	Остеокласт-формиране, стимулирано (+) или инхибирано (-) от остеобластите или имунните клетки	Остеокласт-формиране стимулирано (+) или инхибирано (-) от матуриралите остеокласти или остеокласт-прекурсори
Интерлевкин 1	да	+ (директно)	+(директно-остеокласти)
Интерлевкин 6	да	+ (директно)	+ (остеокласти); -(остеокласт-прекурсори)
Tumor necrosis factor – alpha	да	+ (директно)	+(директно-остеокласт-прекурсори)
Простагландин E2	да	+	

Установена е ролята на **IL-1** и **TNF-alpha** в индуцирането на костна резорбция посредством промотиране на диференциация на остеокластните прекурсори и последващото активиране на остеокластите. Те причиняват тъканно увреждане като стимулират освобождаването на простагландин E2 от моноцитите и фибробластите и на матриксметалопротеинази, разграждащи екстрацелуларния матриксен протеин.

Друг проинфламаторен цитокин със съществена роля в патогенезата на хроничния пародонтит е **интерлевкин 6 (IL-6)**, чиято секреция спомага за матурирането на В-клетките в имуноглобулин-продуциращи плазматични клетки. Тази находка се асоциира с присъствието на повече такива клетки в пародонталните лезии и с откриването на специфични антитела срещу *Porphyromonas gingivalis*. В съвременни проучвания IL-6, произведен от остеобластите, показва способност да индуцира костна резорбция. IL-6 участва също в тъканната деструкция чрез индуциране продукцията на анти-колаген тип 1 антитела от CD5+ В клетките, които са увеличени в тъканите на пациенти с хроничен пародонтит, сравнено със здрави лица (127,167).

Подобно на интерлевкин 1-бета, **Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)** може да се счита за основен медиатор на имунния отговор при пародонтит, тъй като се продуцира директно от редица клетки и общо активира имунния отговор чрез вторичните медиаторни молекули, индуцира химиокини, адхезионни молекули и простагландин E2. TNF-alpha повишава фагоцитната и неутрофилната активност, индуцира секрецията на матриксните металопротеинази и стимулира диференцирането на остеокластите, предизвиква апоптоза във фибробластите. При плак-индуцирано възпаление (каквото е

асоциираното с хроничния пародонтит) нивата на TNF-alpha са увеличени (100,167). Установено е, че както IL-1beta, така и TNF-alpha присъстват в по-високи нива и имат характерна експресия във възпалените гингивални тъкани при пародонтит.

Интерлевкин 6 е цитокин, който също както IL-1beta и TNF-alpha се явява рано в имунния отговор при пародонтит. Активира се от други цитокини (IL-1beta и TNF-alpha) и се произвежда от широк спектър клетки – активирани Т-клетки, В-клетки, макрофаги, дендритни клетки, и т. нар. неимунни клетки (кератиноцити, ендотелни клетки и фибробласти). Активностите му са в: имунната система, кардиоваскуларната и нервна системи, хематопоезата; сигнализира протеините от акутната фаза на отговора (С-реактивния протеин) в хепатоцитите, локализиращия имунен отговор (пародонталното заболяване). Регулира пролиферацията и диференцирането на В-клетките, диференцирането на дендритните клетки, стимулира костна резорбция и развитието на остеокластите (4,100,148,163,167). IL-6 е установен в повишени нива в гингивалната течност и в тъканите при пациенти с пародонтит. Предполага се, че той може да повлияе диференцирането на моноцитите в остеокласти, да повлияе също и развитието на локализираните В-клетки в периодонциума. Taylor (2010) счита, че IL-6 играе важна роля в „обновяването“ на алвеоларната кост (localized bone turnover) тъй като може да повлияе диференцирането на моноцитите в остеокласти и увеличените нива на IL-6 могат да влияят върху развитието на В-клетките в периодонциума (167).

5.2. Връзка между повишените нива на пародонтопатогените и експресията на проинфламаторните цитокини.

Редица автори са насочили своите изследвания върху такава връзка и са получили резултати в подкрепа на твърдението, че присъствието на определени микроорганизми е в положителна корелация с генната експресия на цитокините в гингивалната течност и в гингивалните тъкани (17,62,108,127,149). Малко са данните в литературата за връзките на нивата на пародонтопатогените с тежестта на пародонталните заболявания в корелация с различната дълбочина на пародонталните джобове. Най-често такива опити за корелация между биомаркери и микробиологични данни, получени от едни и същи участъци (пародонтални места) са ограничени от броя на изследваните бактериални видове и броя на изследваните цитокини. Teles et al. (2010) проучват зависимостта между биомаркери от гингивалната течност (IL-1 β , IL-8,

ММР-8), нивата на 40 бактериални вида и клинични параметри на пародонталното заболяване. Те откриват положителна корелация между тези три биомаркера и основните клинични критерии, както и с пропорциите на бактериите от червения и оранжевия комплекси. Авторите установяват, че бактериите от червения комплекс са позитивно асоциирани с експресията на изследваните от тях цитокини. Те свързват проучванията си с дълбочината на пародонталните джобове, но се ограничават в сравнението на плитките джобове в изследваните групи - пародонтално здрави лица и лица с пародонтит. Автори намират статистически значимо увеличение на IL-1beta и IL-8 при пациентите с пародонтит (41,170).

Малкото данни от литературата включват изследването на: Engebretson et al. (2002), които достигат до заключение, че при пациенти с тежък пародонтит има повишени нива на IL-1beta в сравнение с пациентите с лек и умерен пародонтит (49); и Rescala et al.(2010), които установяват също повишени нива на IL-1beta в дълбоки пародонтални джобове в сравнение плитките с преобладаване на бактериите от червения комплекс (135). Изследванията за интерлевкин-6 и ангажирането му в процесите на пародонталната деструкция са малобройни, но категорични за ролята му като медиатор на отговора на организма от мащаба на интерлевкин -1 бета и тумор-некротизиращия фактор алфа.

Vaquí et al. (1998) изследват и доказват връзка между присъствието на патогените *Porphyromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum* и продукцията на интерлевкин-6 от човешки моноцити (20). Това е в съгласие с изводите на Roberts et al.(1997), които установяват, че мононуклеарните клетки, произлезли от периодонталния лигамент, имат капацитета за отговор към пародонталните патогени и вирулентните им фактори, както и да индуцират експресия на про- и анти-инфламаторни цитокини (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, TNF- α , IFN-gamma) в засегнатите от пародонталното заболяване тъкани. Тези автори внушават и съществена роля на **TNF- α** в процесите на пародонтална деструкция (138).

5.3. Ефекти на цитокините в патогенезата на пародонталното заболяване.

На базата на някои добре изучени и познати качества на цитокините и различни доказателства от проучвания на пародонталните заболявания е известно, че про-инфламаторните цитокини като **IL-1**, **TNF- α** и **IL-6** са първите сигнални цитокини, които са също така и преобладаващи в пародонталната лезия (166a).

Дали цитокините са част от рационалните терапевтични прицелни обекти за пародонталното заболяване? Описанието на действието на цитокини от групата на **IL-1** и **IL-6** с тяхната експресия и биологична активност се смята от някои автори като бъдеща възможност за терапевтични интервенции – т.е. „анти-цитокин” терапия или модулиране на отговора на организма.

Цитокините са важен елемент от регулацията на инфламаторните отговори на организма изобщо. На базата на направените в литературата асоциации между пародонталните инфекции и системните заболявания като кардиоваскуларните болести, остеопороза, ревматоиден артрит и др., днес все повече се възприема схващането за хроничния пародонтит като полигенно заболяване със сложна етиология и взаимовръзки с другите хронични възпалителни заболявания. Деструкцията на тъкани при хроничен пародонтит може да е свързана с локалните нива на деструктивни цитокини като **IL-1**, **TNF- α** и **IL-6** (166a). Повечето направени изследвания се стремят към постигане на холистично разбиране на възможността тази комплексна система да се използва за предикция на деструктивните ефекти при пародонтит (47a,138a). Затова допълнителни данни за ефектите на основни проинфламаторни фактори в патогенезата на пародонталното заболяване биха били полезни за по-добро разбиране на пародонтита и по-диференциран контрол на заболяването.

5.4. Присъствие на генен полиморфизъм за основни инфламаторни цитокини (интерлевкин-6 (IL-6) - алел IL-6-174 и G-597A, тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α) – алел -308, и лимфотоксин алфа (LT- α)) във връзка с хроничен пародонтит.

Данните от многобройните изследвания в реферираната литература показват ясно значимостта на плак-индуцираното гингивално възпаление за развитието на хроничния пародонтит, но познанията за т.нар. „податливост” към пародонтално заболяване и характеристиките на отговора на организма са повод за актуална дискусия (32a,83,144,166). Редица автори търсят доказателства за детерминанти за хроничния пародонтит, свързани с организма, базиращи се на хипотезата, че генетични фактори са в основата на определянето и модулирането на индивидуалната чувствителност на индивидите към пародонтит. Има доказателства, че индивидуалната реактивност към заобикалящата среда и различно изразения имуноен отговор при пародонтит са свързани с генетични фактори. Според Michalowicz et al. 2000, в 50% от случаите хроничният

пародонтит е свързан с наследственост (113). Други автори смятат, че всъщност персистиращото гингивалното възпаление е основният рисков фактор за загубата на клиничен аташман и последващата загуба на зъби (98,145,146,159). Много автори правят асоциация между податливостта към гингивит и тази към пародонтит (44,173).

При разглеждане на механизмите на инициране и прогресия на хроничния пародонтит може да се направи аналогия с други възпалителни заболявания и състояния, за които е известно, че показват големи вариации в клиничния ход. Едно обяснение за това би могло да е именно влиянието на различните генни полиморфизми в болестния процес. Според някои автори подгрупи пациенти от популацията биха могли да имат определен генетичен профил с различни генни вариации и това да определя т. нар. „податливост” за клиничната експресия на заболяването. Подобно на други комплексни заболявания би могло да се очаква, че определени основни гени са въввлечени и в патологичния процес при хроничен пародонтит (160).

В литературата има някои публикации с опити за идентифициране на генетични фактори във връзка с пародонтита. (71,113,144a). Основно място в тях заемат изследванията за полиморфизъм на интерлевкин 1 бета (IL 1 β), интерлевкин-6 (IL-6) и тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α). Интересът към факторите, обуславящи продукцията на тези цитокини е разбираем, тъй като е известна ролята им като цяло в патофизиологията на възпалението (176), и в частност - при пародонталните заболявания (40,48,51,93,164,176). Във връзка с хроничния пародонтит автори са фокусирали усилия върху откриване на присъствие на генния полиморфизъм на интерлевкин-1 β и връзката с пародонталната деструкция. Представени са данни за установени значими асоциации с пародонталните деструктивни заболявания и тежестта на загубата на аташман и кост при хроничен пародонтит (6,86).

Подобно на интерлевкин -1 β , тумор некротизиращият фактор алфа (TNF- α) се смята също за ключов цитокин при развитието на инфламаторния отговор при пародонтит и би могло да се допусне, че е от значение за ефективността на имунния отговор, както и за степента на клиничните резултати в хода на антиинфламаторната терапия на заболяването (76,150). In vitro проучвания показват индивидуални различия в продукцията на TNF- α при различни възпалителни стимули (11). Авторы представят доказателства за значимостта на полиморфизма на TNF- α (по-точно транзицията на гуанин - guanine (G) в аденин - adenine (A) на TNF- α – 308 алел и увеличен риск при заболявания като: улцеративен колит и болестта на Crohn (36,161). и пародонтит (51,56). От друга страна автори установяват, че носителството на алел LT- α -252 (по-

рано левкотоксин алфа е наричан тумор некротизиращ фактор бета) е било свързано с увеличената продукция на TNF- α както *in vitro* (112), така и *in vivo* (73,104,130). През 1998г. Kornman и Di Giovine съобщават за увеличена TNF- α -308n2 алелна честота при пациенти от бялата раса с хроничен пародонтит в сравнение с пародонтално здрави индивиди. Освен това авторите установяват и корелация с тежестта на пародонталното заболяване (90). Също така Galbraith et al. (1999) намират TNF- α -308n2 алел за рисков фактор по отношение тежестта на хроничния пародонтит (56,57). През 2003г. Lin et al. демонстрират също повишена честота на TNF- α -308n2 алел при китайски пациенти с хроничен пародонтит (95). Противоположни са обаче резултатите на Fassmann et al. (2003), които не показват при чешки пациенти TNF- α (-308G/A)-полиморфизъм да е асоцииран с хроничния пародонтит (51).

Във връзка с пародонталните заболявания през последните години са изследвани и други генни полиморфизми като например на IL-6 ((-174) G/C, (-190) C/T и (-597) G/A) (143,144).

Интерлевкин-6 е проинфламаторен цитокин, асоцииран с пародонталните деструктивни промени в тъканите и се предлага за един вид „биомаркер“ за прогресията на пародонтита (58). Интерлевкин 6 (IL-6) се продуцира от различни клетки: моноцити, макрофаги, активирани Т-клетки, мастоцити, ендотелни клетки, фибробласти. Той се смята за регулатор на имунния отговор, хемопоезата, взаимоотношението между елементите на остро и хронично възпаление и има отношение към повишената костна резорбция чрез увеличаване на остеокластното формиране (55,88). Повишената продукция на IL-6 във възпалени тъкани често се свързва с повишена продукция и на други цитокини като например интерлевкин 1-бета (IL-1b) и тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α) (79,88). Локалната продукция на IL-6 във възпалени тъкани на пародонта е установено да корелира с дълбочината на джоба при сондиране (46,58,61,96,111,133).

Някои изследвания показват, че непосредствено след субгингивално инструментирание серумното ниво на IL-6 се увеличава вероятно на базата на травматичното възпаление (38,53,78). Освен това автори внушават, че намаляването на серумните нива на IL-6 след проведена пародонтална терапия позволява прилагането му като критерий за оценка на разрешаване на пародонталното възпаление (39,40). Други автори изследват IL-6-174 генен полиморфизъм GG генотип и установяват асоциирането му с разпространението на пародонталното заболяване при пациенти с умерен и тежък пародонтит (171). Raunio et al., 2007 изследват генен полиморфизъм на

IL-6-174 генотип и правят заключение, че разпространението на умерения и тежкия пародонтит и изследвания генотип корелират със серумната концентрация на IL-6 (132).

В съвременната литература пародонталното възпаление се разглежда в два аспекта. От една страна инфламаторният отговор има протективна роля тъй като цели елиминирането на микроорганизмите от засегнатите тъкани. От друга страна при хроничното възпаление персистирането на експресираните медиатори на възпалението може да доведе и до тъканна деструкция с характерните и за пародонтита патологични тъканни промени (загуба на епително прикрепване, съединителнотъканен аташман, периодонтален лигамент, алвеоларна кост). Прогресията на пародонтита е резултат от специфичното комбиниране на редица фактори на средата, на макроорганизма, включително генетични, между които: присъствието на патогенни микроорганизми, високи тъканни нива на инфламаторни цитокини, продукция на деструктивни ензими (матриксни металопротеинази) и химични фактори - простагландини (123). Някои автори асоциират определени полиморфизми, засягащи цитокините генни последователности с транскрипционна активност (122,130,151,177).

Заместването на G с C в позицията -174 на промотора на IL-6 се намира непосредствено срещу позиция от -173 до -151, която се счита отговорна за началната транскрипция (116). Във връзка с това за алел C е установено, че води до алтерация на IL-6 генната транскрипция и съответния отговор към стимулиращи дразнители като липополизахариди (LPS) и IL-1 (52). Същите автори изказват мнението, че този алел има отношение към генетичната податливост към възпалителни заболявания. По същия начин автори установяват, че с подобни структурно-функционални нарушения е свързано заместването на G при позиция -308 за TNF- α (26,129).

На базата на резултатите от задълбочени изследвания за генетичните фактори при пародонтит са създадени и търговски достъпни тестове за определяне на „податливостта” на пациентите към пародонтит. В основата им е открития генен полиморфизъм на интерлевкин-1 β (179). Те се състоят в определяне на единични нуклеотидни полиморфизми (single nucleotide polymorphisms) за IL-1 α в позиция +4845 или -889 (идентични), и за IL-1 β в позиция +3954. Всички тестове са на базата на ДНК анализ чрез полимеразно-верижна реакция - polymerase chain reaction (PCR).

Ролята на позитивния IL-1 генотип е разгледана от Socransky et al. (2000) при бялата раса (75). Те намират асоциация между този генотип и тежкия хроничен пародонтит само при възрастни индивиди и дълбоки пародонтални джобове. Затова

внушават позитивния генотип като фактор за тежест на пародонтита. Други изследователи намират позитивен генотип (по алел 2) само при 8 % от изследвани афро-американци (Walker et al. 2000) и само в 2.3 % от изследвани китайски пациенти (Armitage et al. 2000), но този генотип се среща при всеки трети бял пациент (75). Позитивният генотип придобива по-голяма значимост в присъствието на други допълнителни рискови фактори за пародонтит: пушене, лоша орална хигиена, системни заболявания (диабет, HIV), стрес, възраст (75).

Малкото проучвания върху значимостта на генетичните фактори за хроничния пародонтит не дават ясен отговор за значимостта и механизмите на влияние на присъствието на полиморфизъм за инфламаторни цитокини върху експресията на хроничния пародонтит. Противоречивите засега данни от литературата дават основание да се предприемат изследвания върху генни полиморфизми на важни цитокини, за които се знае, че са въввлечени в протективно-деструктивния имунен отговор при пародонталните заболявания.

В заключение:

Микроорганизмите от денталния биофилм играят съществена роля в етиологията и патогенезата на деструктивните пародонтални заболявания. Някои от тях могат да се срещат и като нормални обитатели на оралната микрофлора и при пародонтално здрави лица, а не само при пациенти с пародонтит. На базата на проведени изследвания може да се твърди, че определени представители на субгингивалната микробиота като: *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. micros*, биха могли да се имат предвид като сигнификантни маркери за деструктивната пародонтална лезия. Пародонталните патогени провокират имунния отговор на организма и промените резултират в нарушаване на баланса между процесите на костно формиране и костна резорбция, чието регулиране е в строга връзка с имунната система и също така зависимо от нивата на освободените цитокини и инфламаторни медиатори. Те от своя страна влияят силно върху разграждането на колагена и прогресията на тъканната и костната деструкция. В разгръщането на инфламаторния имунен отговор на организма в резултат на вирулентната субгингивална бактериална инфекция и детерминирането да бъде или не развита пародонталната деструкция (пародонтита, тежестта и прогресия му) обаче се намесват и други фактори - на поведението, средата и генетични.

Дисертационната работа е насочена към разкриване на бактериалната находка при хроничен пародонтит във връзка с генерализираната и локализирана тежест на загуба на аташман и кост с цел установяване на микробиологични критерии, свързани с тежестта на заболяването. От друга страна се цели установяване на ефектите на повишените нива на инфламаторни фактори при хроничен пародонтит, които да се приемат за маркери на деструктивен отговор на организма към бактериалното дразнене при пародонтит и могат да са полезни в индивидуалната оценка на заболяването.

Създаването на диагностичен протокол с микробиологични и биохимични критерии на базата на доказателства ще повиши познанията и възможностите на клиницистите в разпознаването и контрола на хроничния пародонтит.

ПРОБЛЕМИ

При разработването на дисертационната работа се оформиха следните проблеми:

1. Решени проблеми:

- 1.1. Хроничният пародонтит е възпалително-деструктивно заболяване, характеризиращо се с промени в поддържащите зъбни структури – гингива, периодонтален лигамент, цимент, алвеоларна кост.
- 1.2. Хроничните пародонтити са широко разпространени и социално значими заболявания, които могат да доведат до влошено качество на живота на индивидите заради нарушено хранене, загуба на зъби, социално-икономически и психологични причини.
- 1.3. Установено е, че някои от основните пародонтални патогени от субгингивалния биофилм притежават вирулентни възможности и се асоциират здраво с етиологията и патогенезата на пародонтита.
- 1.4. Днес се знае, че биофилмите са място-специфични, комплексни полимикробни общности, които проявяват резистентност към антимикробни агенти и защитните механизми на организма.

2. Частично решени проблеми:

- 2.1. Няма засега достатъчно ясни доказателства за факторите, въввлечени в прогресията на гингивитите в пародонтити, също така и за тези, ангажирани с тежестта и прогресията на хроничните пародонтити.
- 2.2. Има твърде лимитирани данни за субгингивалния микробен профил в пародонтални джобове с различна дълбочина при пациенти с хроничен пародонтит в българската популация.
- 2.3. Малко са данните в литературата за връзките на нивата на пародонтопатогените с тежестта на пародонталните заболявания в корелация с различната дълбочина на пародонталните джобове.
- 2.4. Обсъжда се ролята на редица рискови фактори, които могат да повлияят хода, тежестта и прогресията на заболяването, податливостта и

резистентността – системни или локални, променливи (тютюнопушене, стрес, диабет) или непроменливи (генетичните фактори).

- 2.5. Има данни за връзката между присъствието на генен полиморфизъм на интерлевкин-1 β и пародонталната деструкция.

3. Нерешени проблеми:

- 2.6. Поражда интерес определянето на присъствието и нивата на известни или още недоказани като пародонтопатогени бактерии в субгингивалната микробиота и тяхната връзка с инициирането и прогресията на загубата на пародонтален аташман.
- 2.7. Няма данни, че генната експресия на цитокините в гингивалната течност и/или в гингивалните тъкани при пациенти с хроничен пародонтит в нашата популация е в положителна корелация с присъствието на определени микроорганизми.
- 2.8. Няма данни за изследвания върху генния полиморфизъм на инфламаторните цитокини: интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- α) и лимфотоксин алфа (LT- α) при пациенти с хроничен пародонтит в Българската популация.
- 2.9. Няма данни за изследване влиянието на рискови фактори като възраст, пол, тютюнопушене, системни заболявания, генетични фактори, върху хода на пародонтитите в нашата популация. Идентифицирането на някои от тези фактори е необходимо в диагнозата на предикцията и контрола на прогресията на хроничния пародонтит.

ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

Да се оцени бактериалната находка, възпалителните и генетични компоненти в отговора на организма при тежък хроничен пародонтит.

ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. Да се проведе скрининг на пациенти за сформирани на подходящи за проучването групи с диагноза хроничен пародонтит.
2. Да се оцени бактериалната находка при хроничен пародонтит:
 - 2.1. Основни пародонтопатогени при пародонтални джобове с различна дълбочина (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) във връзка с тежестта на пародонтита;
 - 2.2. Пълен пародонтопатогенен спектър при дълбоки пародонтални джобове (9 контролни шама: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacterium gingivalis*) във връзка с тежестта на пародонтита;
 - 2.3. Субгингивално и орално присъствие и нива на *Candida albicans* при хроничен пародонтит.
3. Да се оцени генната експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- α)) при тежък хроничен пародонтит.
4. Да се оцени генният полиморфизъм на интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- α) и лимфотоксин алфа (LT- α) при тежък хроничен пародонтит.
5. Да се получат данни за влиянието на рисковия фактор тютюнопушене при хроничен пародонтит.
6. Създаване на алгоритъм на диференциран подход в диагнозата на тежкия хроничен пародонтит на базата на бактериалната находка и компоненти на отговора на организма.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛИ

- **Общ брой участници в изследването – 80.** От тях: пациенти с хроничен пародонтит – 70 и индивиди със здрав пародонт – 10.
 - **задача 1.** Скринингово изследване за селекция на пациенти и включване в проучването – общо 156 индивида. От тях 82 индивида отговарят на включващите критерии. Пациентите, отказали участие са 2. В изследването са включени 70 пациента с хроничен пародонтит за оценка на пародонталния статус и 10 индивида със здрав пародонт като контролна група по задача 4.
 - **под-задача 2.1.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза хроничен пародонтит за изследване на присъствието на пародонталните патогени *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* в пародонтални джобове с различна дълбочина (до 4мм, 4-6мм и над 6мм).
 - **под-задача 2.2.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза хроничен пародонтит за изследване на едновременното присъствие на: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis* в дълбоки пародонтални джобове (над 6мм).
 - **под-задача 2.3.** Изследването обхваща 20 пациента с диагноза хроничен пародонтит за изследване на присъствието на *Candida albicans* в дълбоки пародонтални джобове (над 6мм).
 - **задача 3.** В изследването са включени 20 пациента с хроничен пародонтит за изследване на генната експресия на IL-6 и TNF- α .
 - **задача 4.** В изследването са включени 30 пациента с хроничен пародонтит и 10 пародонтално здрави индивиди като контролна група за изследване на генния полиморфизъм на IL-6, TNF- α и LT- α .

- **задача 5.** В изследването са включени данните от 70 пациента с хроничен пародонтит.

Включващи критерии за изследването:

- системно здрави пациенти с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит (основен критерий – CAL: при CALср.ст. 3-4мм диагнозата се определя като умерен пародонтит, при CALср.ст. 5мм диагнозата се определя като тежък пародонтит; допълнителни критерии: костна загуба над 2мм, дълбочина на джобовете при сондиране над 4мм) (14,19), относително запазена дентиция (15 - 20 налични зъба), нелекувани пародонтално през последната 1 година.
- индивиди със здрав пародонт в контролна група.

Исключващи критерии: системно заболяване, системна медикация, бременност, приемали системно антимикробни средства през последните 6 месеца.

2. МЕТОДИ

Скрининг

Етапите на работа за определяне на подходящи пациенти за проучването и регистрирането и обработването на данните са представени на следната схема:

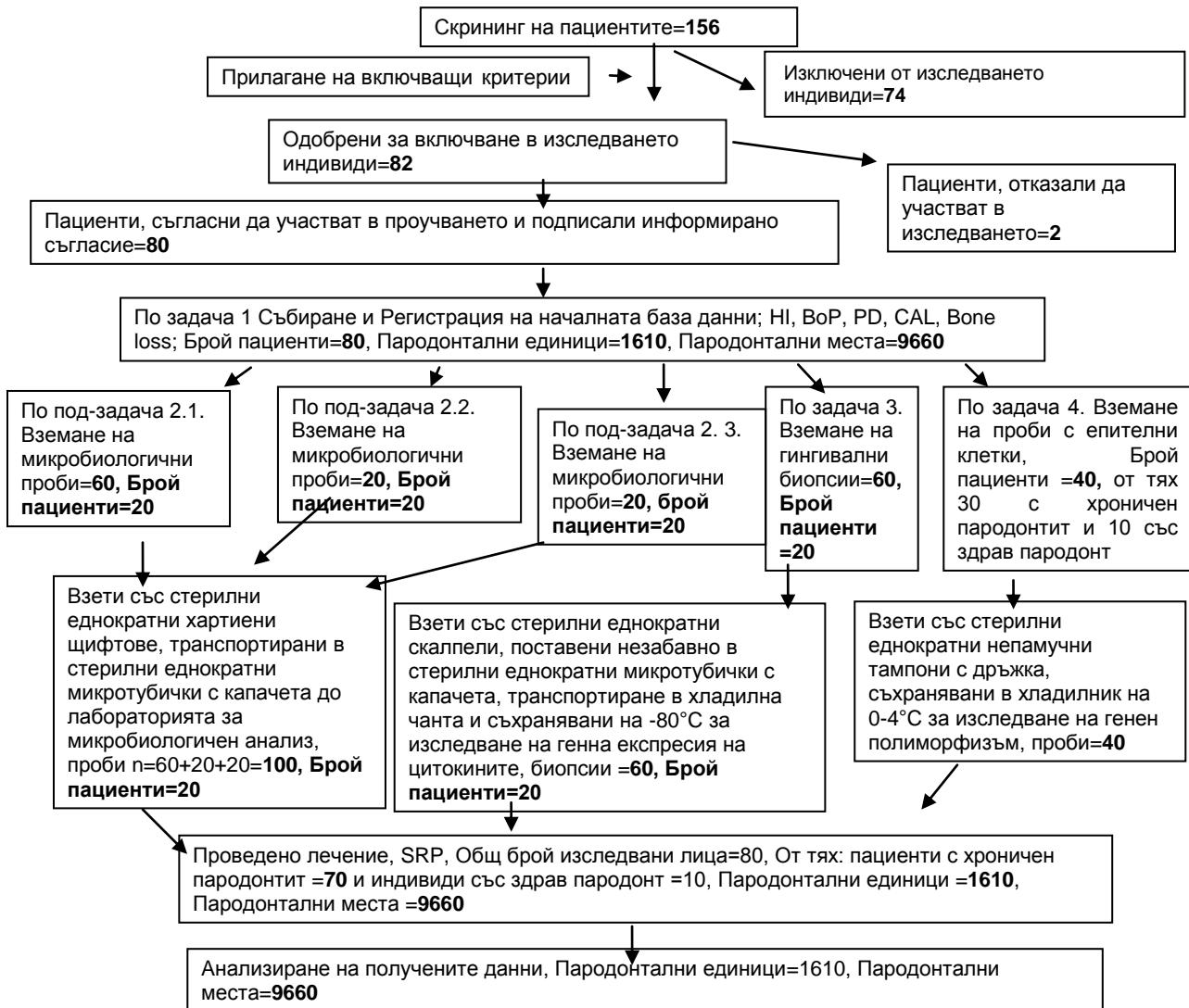


Схема 1. Схематично представяне на материалите и методите за изследването.

Методите в изследването са:

- 2.1. Клинични и рентгенографски;
- 2.2. Лабораторни;
 - 2.2.1. Микробиологични;
 - 2.2.2. Молекулярни;
 - 2.2.3. Генетични;
- 2.3. Статистически.

2.1. Клинични и рентгенографски критерии в диагнозата

Пациентите се изследват по следните клинични параметри:

2.1.1. Гингивален статус

- ✓ Индекс за кървене на гингива (РВІ- Papillary bleeding index, за оценка на тежестта и разпространението на гингивалното възпаление, Saxer&Muhleman 1975г.). РВІ се представя като числова стойност на средно кървене за определяне тежестта на възпалението и е подходящ за мотивиране на пациентите. Средни стойности до 1 показват леко, 1-2 – умерено и 3-4 - тежко гингивално възпаление.

2.1.2. Пародонтални параметри

- ✓ BoP (bleeding on probing) в % (Ainamo & Bay 1975г.)- пародонталната сонда се въвежда до дъното на пародонталния джоб и се придвижва внимателно около зъбната (коренова) повърхност вестибуларно и орално. При наличие на провокирано кървене при инструментирание пародонталното място (вестибуларна, лингвална, медиална и дистална повърхност) се отбелязва в регистрационната карта като „кървене” - „+”; липса на кървене - „-”). Определя се обхват на кървене в проценти. Тежестта на гингивалното възпаление се изразява чрез процента на кървящите места. Тъй като изследваните места са много на брой, този индекс е предназначен за индивидуалното изследване на данните от различните визити на пациента.

- ✓ Дълбочина на джоба при сондиране в мм (PD- pocket depth). На основата на този параметър оценяваме пародонталните джобове като плитки, средно дълбоки и дълбоки съответно до 4мм, 4-6мм и над 6мм;
- ✓ Загуба на аташман в мм (CAL- clinical attachment level). Този параметър в най-голяма степен служи при определяне на диагнозата по тежест: 1-2мм – лек пародонтит, 3-4мм – умерен по тежест и 5мм – тежък пародонтит (14);
- ✓ Състояние на фуркациите (F- Furcation involvement, Hamp1975г.);
- ✓ Подвижност на зъбите (степени от 1 до 3, Miller`s mobility index 1950г.).

2.1.3. Оралнохигиенен статус

- ✓ Хигиенен индекс (HI- Hygiene index, за оценка на процента свободни от плака зъбни повърхности, O`Leary et al.1972г.).

Данните се въвеждат в пародонтална карта.

*Измерванията в мм се правят в 6 точки за всеки зъб (медиобукална, букална, дистобукална, медиолингвална, лингвална, дистолингвална), с градуирана пародонтална сонда CP15 (Hu Friedy®).

2.1.4. Рентгенографски критерии

Рентгенографски методи на изследване – имат за цел точното определяне на диагнозата „хроничен пародонтит” при селектираните пациенти с регистриране на загубата на интерденталната алвеоларна кост (над 2мм). При пациентите са прилагани следните рентгенографски техники: 1) ортопантомография и 2) интраорална ретроалвеоларна рентгенография.

2.2. Лабораторни методи

2.2.1. Идентификация на субгингивални пародонтопатогени

– Във връзка с под-задача 2.1. Селекция на местата за вземане на микробиологичните проби: при 20 пациента са изследвани три пародонтални патогена в пародонтални джобове с различна дълбочина – плитки (до 4 мм), средно

дълбоки (от 4 до 6 мм) и дълбоки (над 6 мм) – 60 микробиологични проби. За избягване на контаминация супрагингивалната зъбна плака от селектирания зъб е отстранявана със стерилен инструмент – скалер или пародонтална кюрета след предварително изолиране с памучна ролка и подсушаване с лека въздушна струя. Във всеки пародонтален джоб се въвежда стерилен ендодонтски хартиен щифт за минимум 10 сек. Книжните щифтове се изваждат от джоба и се поставят веднага в стерилна епруветка от предоставения от фирмата диагностичен кит. Така се изпращат за анализ.

За целите на изследването определянето на прицелните пародонтални патогени (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и общ брой микроорганизми) се извърши по Real-Time PCR метод.

Всички места на взимане на микробиологичните проби са отбелязвани в стандартните бланки на PET test.

Във връзка с под-задача 2.2. При 20 пациента с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит, поставена на базата на клиничните и рентгенологични диагностични методи се определя присъствието и нивата на основните пародонтопатогени – 9 прицелни щамове (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis* и общ брой микроорганизми) в дълбоките пародонтални джобове се извърши чрез real-time PCR анализ на апарат Real-time – 20 микробиологични проби.

Всички места на взимане на микробиологичните проби са отбелязвани в стандартните бланки на PET plus test.

Във връзка с под-задача 2.3. Изследването обхваща 20 пациента с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит, поставена на базата на клиничните и рентгенологични диагностични методи. Във връзка с изпълнението на тази задача беше приложен real-time PCR анализ за:

- Определено беше присъствието и количеството на изследваните 5 щамове на *Candida spp.* в субгингивална плака (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*+ общ брой *Candida*);

- Определено беше присъствието и количеството на изследваните 5 щама на *Candida spp.* по орална лигавица (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*+ общ брой *Candida*).

Пробите са вземани със стерилен книжен щифт от пародонтални джобове с дълбочина **над 6 мм** при пациенти с хроничен пародонтит (20 проби) и със стерилен памучен тампон от областта на устната лигавица (20 проби) - дорзалната повърхност на езика. Всички места на взимане на микробиологичните проби са отбелязвани в стандартните бланки на CAT test.

2.2.2. Молекулярна оценка на отговора на организма

Във връзка с изпълнението на задача 3. Да се оцени отговора на организма чрез нивата на генна експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- α)) при хроничния пародонтит.

В изследването са включени 20 пациента с умерен или тежък хроничен пародонтит.

Молекулярно-биологични: Изследване и определяне нивата на генна експресия на IL-6 и TNF-alpha в гингивалните тъкани – Real-Time PCR метод:

- ✓ Чрез изолиране на РНК от гингивална тъкан;
- ✓ Обратна транскрипция на откритата РНК;
- ✓ Амплификация на получената кДНК с праймери и сонди за IL-6 и TNF-alpha , апарат AB 7 500 Real-Time PCR, TaqMan PCR-реактиви;
- ✓ Анализ на получените резултати, RQ софтуер.

Субстратът за изследването е гингивална тъкан ($3/3\text{мм}^3$ приблизително), която е ексцизирана след поставяне на локална анестезия, и поставена в стерилна пластична епруветка с капаче от 1,5мл. По този начин се транспортира с хладилна чанта до специализирани лаборатории за съхранение на генетичен материал, където се замразява на -80°C до времето на извършване на лабораторния анализ. Тъканта се ексцизира от областта на интерденталната гингива, прилежаща на пародонтални джобове с различна дълбочина – плитки (до 4 мм), средно дълбоки (от 4 до 6 мм) и дълбоки (над 6 мм)-еднократно, три биопсии при всеки пациент (20 пациента), като са взети общо 60 гингивални проби.

За целите на изследването генната експресия на IL-6 и TNF- α в гингивалните тъкани при пародонтит се определи чрез сравнителен количествен анализ – TaqMan

Real-Time PCR. Общата РНК се транскрибира до кДНК посредством RT PCR (reverse transcript PCR) метод. Получената кДНК се амплифицира със специфични праймери и сонди за IL-6 и TNF- α на апарат Real-Time PCR чрез TaqMan PCR реактиви. Принципите са идентични на класическия PCR като той дава само качествен анализ. За разлика от него при **TaqMan Real-Time PCR дава количествена оценка** като се използват: флуоресцентно белязана специфична TaqMan сонда и двойка небелязани праймери. Благодарение на 5'-3' екзонуклеазната активност на Taq-полимеразата при достигане на сондата по време на амплификация Taq-полимеразата срязва сондата и се отделя флуоресценция. **TaqMan Real-Time PCR е по-специфичен анализ** в сравнение с PCR тъй като данните се снемат в експоненциалната фаза, когато факторите на средата не са ограничаващи и не се налага след-амплификационна детекция на резултата.

Протокол за определяне на генна експресия на IL6 и TNF в гингивална тъкан, взети чрез биопсия в съседство на пародонтални джобове с три различни дълбочини, при референтен АСТВ ген - Приложение 1.

2.2.3. Оценка на отговора на организма чрез генетични изследвания

Във връзка с изпълнението на задача 4. Да се оцени отговора на организма чрез присъствието на генен полиморфизъм за инфламаторните цитокини интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- α) и лимфотоксин алфа (LT- α) при тежък хроничен пародонтит.

В изследването са включени 30 пациента с поставена диагноза „хроничен пародонтит” и 10 пародонтално здрави индивиди като контролна група.

За целта на изследването генетичният материал е взет от областта на букалната лигавица, сутрин, без пациента да извършва орално-хигиенни процедури, преди провеждане на професионална пародонтална терапия, чрез стерилен тампон за ДНК изследване, съхраняван на 0-4 °C до момента на извършване на лабораторния анализ.

Лабораторни методи на изследване: PCR RFLP ДНК анализ на полиморфизъм TNF-A (G-308A), IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A) и LT-A (A+252G).

Протокол за изолиране на ДНК от тампони с епителни клетки от букална лигавица чрез органична екстракция - Приложение 2.

2.3. Статистически методи

Използвани статистически програми:

1. Дескриптивна статистика, корелационен анализ, t-тест, ANOVA – IBM SPSS Statistics Version 19, в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. Вариационен анализ – изчисляване оценките на централната тенденция и разсейване.
3. Тест χ^2 и екзактен тест на Фишер – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
4. Непараметричен тест на Шапиро-Уилк – за проверка вида на разпределението.
5. Непараметричен тест на Ман-Уитни – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки
6. Изготвяне на хистограми – Statistica Version 8
7. Клъстерен анализ – Minitab® 16.1.0
8. Принципен компонентен анализ - XLStat Pro 7.5

Статистическият анализ на данните при **задача 3**. е извършен след прилагане на алгоритъм за отстраняване на екстремните стойности („outliers”), основаващ се на междуквartilното разстояние: $[Q_1 - k(Q_3 - Q_1), Q_3 + k(Q_3 - Q_1)]$, като в случая е използван коефициент $k=1,5$.

За изследване на взаимовръзките между клиничните параметри на пародонтита и експресията на изследваните проинфламаторни фактори са използвани рангов Spearman корелационен анализ. За установяване на значими различия между отделните показатели са приложени t-тест на Student, а в случаите на ненормално разпределение и/или липса на равенство на дисперсиите – съответно U-тест на Mann-Whitney. За установяване на значими различия между dCt и ddCt на IL6 и TNF при различна дълбочина на пробата е приложен чифтен t-тест (Paired t-test) с цел да се неутрализира съпътстващия ефект на факторите възраст, пол, тютюнопушене, количество на *T. denticola*, *P. gingivalis* и др.

Процентилите са изчислени по стандартния метод (Нека k да бъде най-голямото цяло число по-малко или равно на $(N+1)*p/100$, и нека $f = (N+1)*p/100 - k$.; Използва се следната формула: $v=f*x_{k+1}+(1-f)*x_k$). При представените бокс-плотове са отбелязани медианата, 25, 75, 10, 90 процентил, както и стойностите, показващи най-съществени отклонения. Въз основа на разликите между 75 и 25 процентил е съдено за значимостта в степента на флукуациите. За значими различия са приети тези, при които разликата е по-голяма от 50 %.(Схема 2, Приложение 3).

В това проучване за референтен ген е използван АСТВ (ген за β -актин). Като калибратор са използвани генните експресии от пробите, взети от различна дълбочина. Статистически методи - Приложение 3 (Фигура 1 и Таблица 1 в приложението).

СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Резултати по задача 1. Да се проведе скрининг на пациенти за сформирани на подходящи за проучването групи с диагноза хроничен пародонтит.

Обща оценка на пациентите с приетите клинични изследвания

Характеристика на селектираните за настоящото проучване пациенти: В изследването участват 70 пациента с хроничен пародонтит, диагностициран на базата на клиничните и рентгенографски критерии, приети в методиката. При изпълнението на задача 4. се изискваше контролна група и в изследването бяха включени 10 лица със здрав пародонт.

В табличен вид са представени данните за всички пациенти с хроничен пародонтит, получени и регистрирани при проучването 70 на брой (таблица 5).

Таблица 5. Параметри на хроничния пародонтит в изследваната група.

Изследвана група	Клинична и рентгенографска характеристика на пациентите	Средно аритметична	Стандартно отклонение	Брой случаи с хроничен пародонтит	P	t
Пациенти	Възраст	49.47	8.25	70	0.001	5.83
Контрола		23.80	1.48	10		
Пациенти	РВІ средна стойност	2.19	0.64	70	<0.001	10.84
Контрола		0.36	0.117	10		
Пациенти	РDmm средна стойност	3.81	0.77	70	<0.001	13.13
Контрола		0.85	0.165	10		
Пациенти	САLmm средна стойност	4.47	1.12	70	<0.001	12.51
Контрола		0	0	10		
Пациенти	Bone lossmm средна стойност	3.06	1.33	70	<0.001	7.22
Контрола		0	0	10		

Данните по инициалния статус показват, че:

- средната възраст на пациентите е 49,47 години като възрастта на участниците в изследването варира между 38 и 70 години.
- РВІ има средна стойност 2,19, което показва наличието на умерено изразено маргинално гингивално възпаление.
- РD има средна стойност е 3,81 мм, но от данните се установи, че варира между 3 и 6 мм, което е средно за отделните пациенти и показва присъствие на умерено дълбоки и дълбоки пародонтални джобове.
- САL средна стойност е 4,5 мм като данните показаха, че варира между 3 и 8 мм, което отговаря на критериите за умерен и тежък хроничен пародонтит.
- Bone loss е със средна стойност 3,06 мм с вариране от 2 до 6 мм, което показва умерена до тежка загуба на маргиналната интердентална алвеоларна кост.

Таблица 6. Орална хигиена и кървене при сондиране.

	Клинични параметри	Средно аритметична	Ст. отклонение	Брой случаи с хроничен пародонтит	P	t
Пациенти	HI%	6.76	3.95	70	<0.001	22.91
Контрола		79.90	3.67	10		
Пациенти	BoP%	95.77	11.84	70	<0.001	25.44
Контрола		0	0	10		

От таблица 6 се вижда, че:

- хигиенният индекс има средна стойност 6,76% като според получените инициални данни варира между 0% и 30%, което показва преобладаване на заети с дентална плака зъбни повърхности.
- BoP е средно 95,77% като данните показаха, че стойностите се движат между 70% и 100%, което е обективен признак за широк обхват на възпалителния процес в гингивата – епител и съединителна тъкан.

Данните са представени като хистограми в Приложение 4.

Анализ на корелациите между параметрите на пародонтита в изследваната група пациенти

Таблица 7. Корелационна зависимост между параметрите на пародонтита.

		HI%	BoP	PBI	PD	CAL	BoneLoss
Възраст	R-коефициент	0.11	-0.02	0.10	0.09	0.06	-0.05
	P - коефициент	0.38	0.90	0.40	0.44	0.61	0.69
HI%	R-коефициент		-0.20	-0.21*	-0.34*	-0.27*	-0.44*
	P - коефициент		0.11	0.08	0.00	0.03	0.00
PBI	R-коефициент			0.17	0.32*	0.26*	0.37*
	P - коефициент			0.15	0.01	0.03	0.00
BoP	R-коефициент				0.10	0.01	0.11
	P - коефициент				0.39	0.92	0.37
PD	R-коефициент					0.89*	0.84*
	P - коефициент					0.00	0.00
CAL	R-коефициент						0.79*
	P - коефициент						0.00

! Значимите корелации са отбелязани с *

Установени са статистически значими коефициенти на корелация, които показват, че съществува обективна връзка между съответните показатели. Така например беше установена силна положителна корелация между дълбочината на джобовете при сондиране и загубата на аташман (0.89) и между дълбочината при сондиране и костната загуба (0.84). Установи се и силна положителна корелация между загубата на аташман и костната загуба (0.79). Умерено силна отрицателна връзка се установи между хигиенния индекс и дълбочината при сондиране (-0.34), както и между хигиенния индекс и костната загуба (-0.44). Умерена по сила положителна корелация е установена между PBI от една страна и от друга - дълбочината при сондиране (0.32) и костната загуба (0.37). Анализът показва по-слаба отрицателна корелация между хигиенния индекс и PBI (-0.21), както и между хигиенният индекс загубата на аташман (-0.27). Установи се и по-слаба положителна връзка между PBI и загубата на аташман (0.26).

Установените статистически значими корелации се обсъждат в литературата и в контекста на получените от нас резултати имаме основание да прецизираме по-нататъшните изследвания като включим допълнителни микробиологични, имунологични и генетични изследвания при пациентите с тежък хроничен пародонтит.

Резултати по задача 2. Да се оцени бактериалната находка при хроничен пародонтит.

Оценка на клиничните и рентгенографски характеристики на пациентите по задача 2.

Изследваните пациенти с хроничен пародонтит са 20 пациенти с диагноза умерен или тежък хроничен пародонтит, от които 6 (30%) мъже и 14 (70%) жени. Средната възраст на участниците в проучването е $50,25 \pm 8,45$ години в интервала между 34 и 70 години.

В това проучване пародонталните джобове бяха категоризирани в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране като: плитки (<4 mm), средно-дълбоки (4-6 mm) и дълбоки (> 6 mm).

Данните на таблица 8 представят клиничните параметри на изследваните пациенти в средни стойности.

Таблица 8. Параметри на пародонтита при различна дълбочина на джоба.

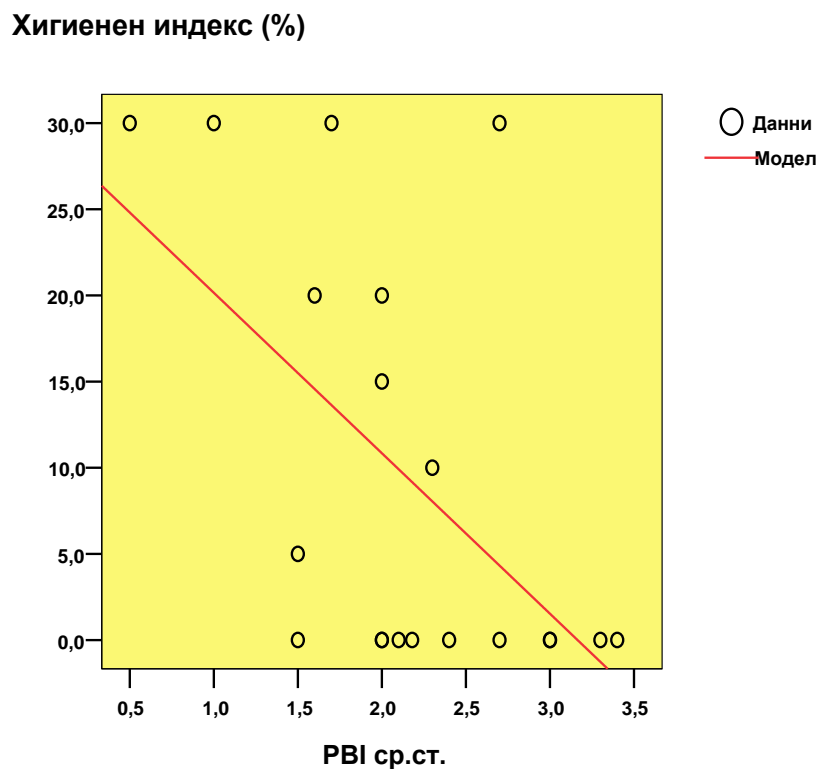
Показатели (средни стойности)	Брой пациенти	\bar{X}	SD
PBI средна стойност	20	2,14	0,74
PD – средна стойност	20	3,88	0,82
PD ≤ 4 mm (брой)	20	51,80	19,64
PD 4 – 6 mm (брой)	20	25,80	10,42
PD > 6 mm (брой)	20	7,80	9,04
CAL mm средна стойност	20	4,40	1,21
Bone loss (mm)	20	3,04	1,48

Данните за основните диагностични критерии показват, че:

- С най-голям брой и най-високи относителни дялове (разпространение) са джобовете под 4 mm. Броят на пародонталните джобове с дълбочина на сондиране

между 4 и 6 мм е по-малък и най-малък е броят на дълбоките пародонтални джобове. Средната стойност за загубата на аташман (CAL=4,40 мм) показва, че при изследваните пациенти преобладава тежък хроничен пародонтит. Средна стойност 2,14 за РВІ говори за умерено гингивално възпаление. При изследваните пациенти се установи умерена по тежест костна загуба (средно 3,04 мм).

Фигура 1. Корелация между оралнохигиенния статус (хигиенния индекс) на пациентите и тежестта на гингивалното възпаление (РВІ средна стойност).

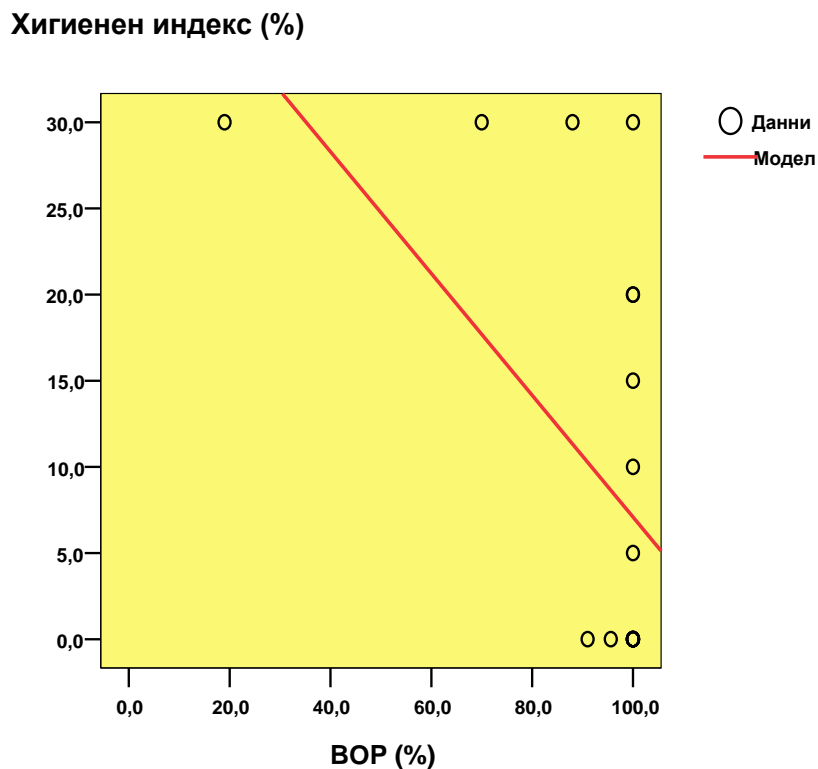


Проведеният регресионен анализ установи наличие на линейна зависимост ($p=0.011$, $R^2 = 0.309$) между хигиенния индекс и РВІ средна стойност:

$$HI = 29,467 - 9,313 * PBI_{mean}$$

където HI е хигиенния индекс в %, а PBI_{mean} – РВІ средна стойност на гингивалното кървене. Зависимостта има правопрпорционален характер - като средностатистическото намаление на HI (свободните от плака повърхности) с около 9% статистически води до увеличението на РВІ средна стойност с 1 единица (фигура 1).

Фигура 2. Корелация между оралнохигиенния статус (хигиенния индекс) и ВоР - % на кървящите места.

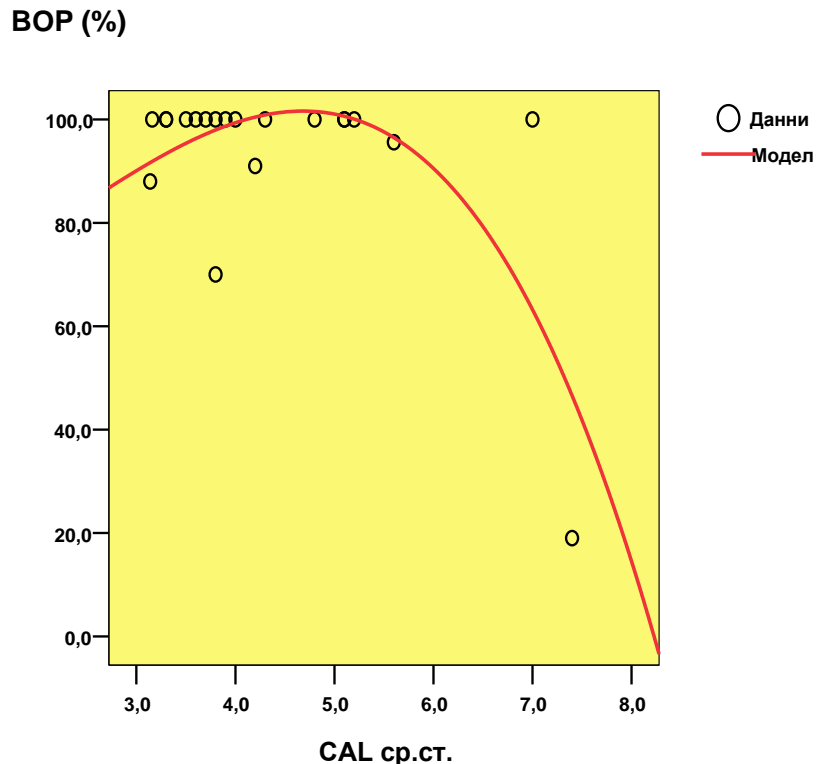


Проведеният регресионен анализ установи наличие на линейна зависимост ($p=0.015$, $R^2 = 0.287$) между хигиенния индекс и ВоР разпространение - % на кървящите места:

$$HI = 42,428 - 0,353 * BoP$$

където HI е хигиенния индекс в % свободни от плака повърхности, а BoP разпространение - % на кървящите места. Анализът показва обратно пропорционален характер като средностатистическото увеличение на HI с около 0,4% (увеличение на свободните от плака повърхности) води до намаление на BoP с 1% (фигура 2).

Фигура 3. Корелация между загуба на аташман (CALmean) и кървене при сондиране (BoP (%)).



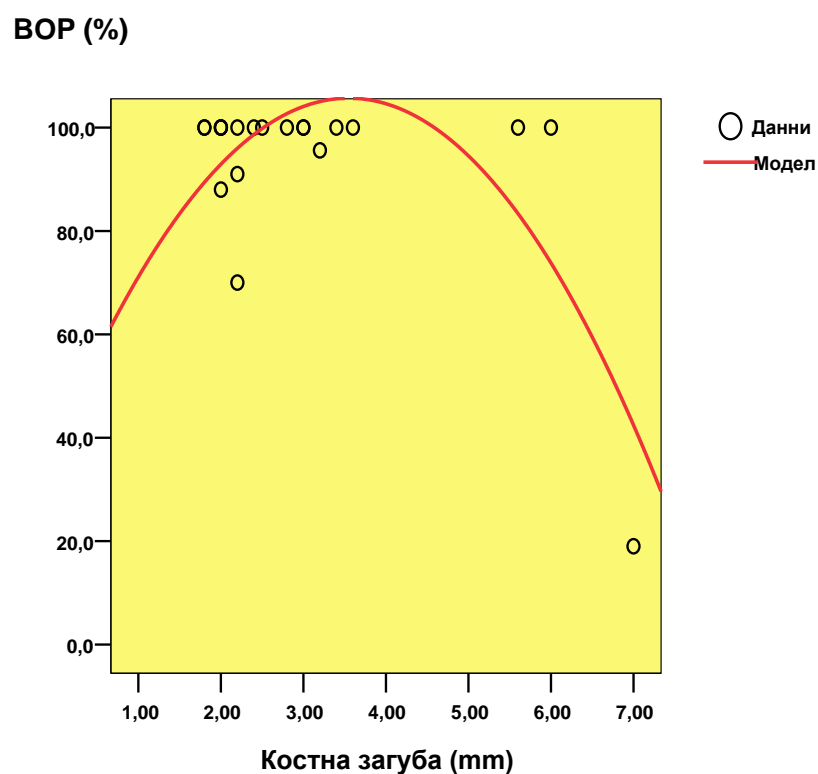
Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ($p=0.002$, $R^2 = 0.527$) между BoP разпространение - % на кървящите места и CAL mm средна стойност – загуба на аташман средна стойност, която се описва най-добре от следното кубично уравнение:

$$\text{BoP} = 62,390 + 5,369\text{CALmean}^2 - 0,765\text{CALmean}^3$$

където BoP е разпространение в проценти на кървящите места, а CALmean – средна стойност – загуба на аташман средна стойност. От фигура 11 се вижда, че при изследваните пациенти BoP (% кървящи места) се увеличава плавно до около 4,5 средна стойност на CALmean, след което се задържа до средните стойности на загубата на аташман от около 6mm и при по-високите стойности кривата показва намаление на разпространението на кървенето при сондиране вероятно поради по начало малкото разпространение на дълбоките джобове с голяма загуба на аташман в групата. Установената статистически достоверна зависимост на загубата на

аташман (CALmean) от разпространението на параметъра BoP потвърждава данни от други изследвания в литературата за това, че кървенето при сондиране има диагностична стойност в определяне на тежестта на пародонтита и рисковия профил на пациентите с хроничен пародонтит.

Фигура 4. Корелация между костна загуба и кървене при сондиране (BoP (%))(p=0.001).

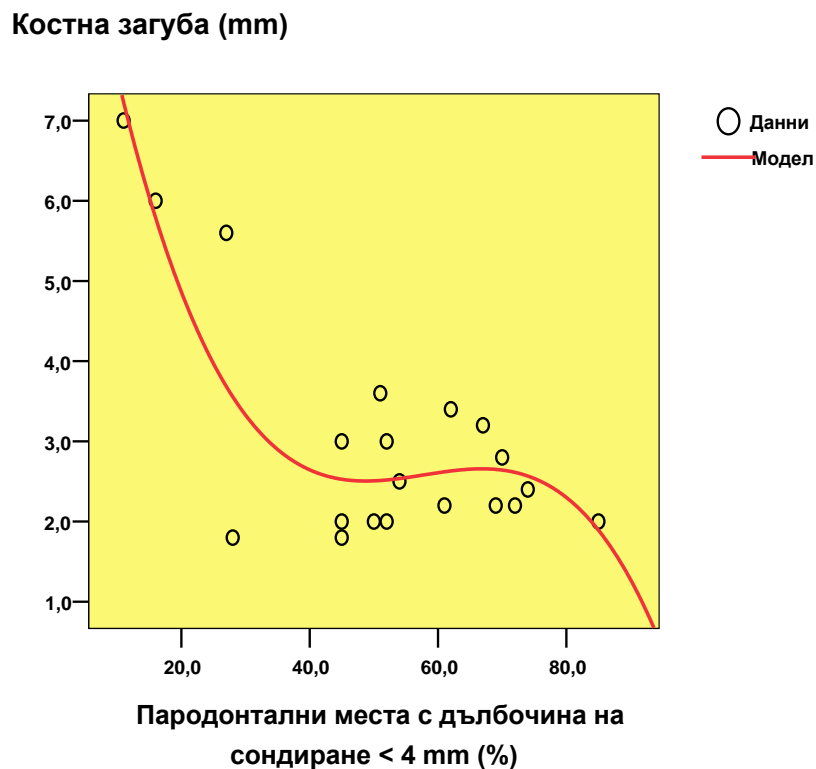


Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост (p=0.001, R² = 0.583) между BoP разпространение - % на кървящите места и загубата на кост, която се описва най-добре от следното квадратично уравнение:

$$\text{BoP} = 38,679 + 37,745 \text{ Bone loss} - 5,315 \text{ Bone loss}^2$$

където BoP е разпространение в проценти на кървящите места, а Bone loss – костна загуба в мм. От фигура 4 се вижда, че BoP се увеличава плавно до около 3,6 средна стойност на Bone loss, след което кривата показва намаление на разпространение на кървенето идентично на показаното на фигура 3.

Фигура 5. Корелация между костна загуба и дълбочина на сондиране < 4 mm.



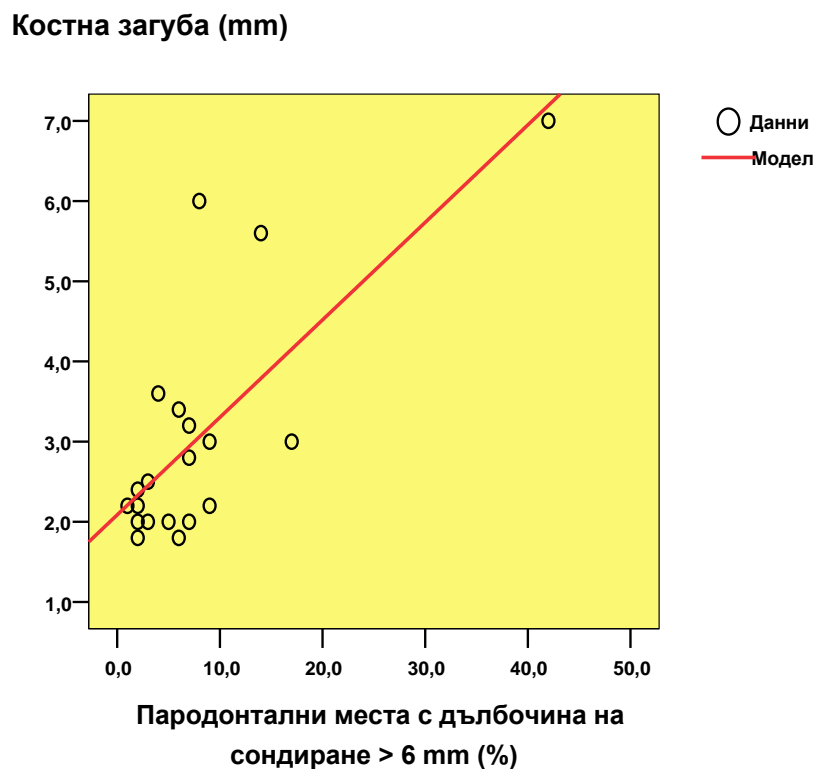
Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ($p < 0.001$, $R^2 = 0.729$) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране < 4 mm, която се описва най-добре от следното кубично уравнение:

$$\text{Bone loss} = 11,718 - 0,500\text{PD_LT_4mm} + 0,009\text{PD_LT_4mm}^2 - 5,11 * 10^{-5} \text{PD_LT_4mm}^3$$

Където: Bone loss е костна загуба в mm, а PD_LT_4mm - пародонтални места с дълбочина на сондиране < 4 mm. От фиг. 5 се вижда, че с увеличаването на PD_LT_4mm до около 40% Bone loss намалява рязко до около 2,7, след това се задържа на приблизително еднакво ниво до PD_LT_4mm около 75%, след което отново пада.

Проведеният регресионен анализ не установи наличие на зависимост ($p > 0.05$) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране между 4 и 6 mm при изследваните пациенти.

Фигура 6. Корелация между костна загуба и дълбочина на сондиране > 6 mm.



Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ($p < 0.001$, $R^2 = 0.729$) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране > 6 mm, която се описва най-добре от следното линейно уравнение:

$$\text{Bone loss} = 2,087 + 0,122\text{PD_GT_6mm},$$

където Bone loss е костна загуба в mm, а PD_GT_6mm - пародонтални места с дълбочина на сондиране > 6 mm. Зависимостта има право-пропорционален характер, като увеличението на PD_GT_6mm с 1% води до среднестатистическо увеличение на Bone loss с около 0,12 mm (фигура 6).

Резултати по под-задача 2.1. Основни пародонтопатогени при пародонтални джобове с различна дълбочина (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) във връзка с тежестта на пародонтита.

Резултатите по изпълнението на под-задача 2.1. са представени на таблица 9 и таблица 10 с вариационен анализ на данните за нивата на пародонтопатогените в

субгингивалните проби по количество като брой $\times 10^4$ (таблица 9) и преваленция като % от общия бактериален товар (таблица 10).

В нашето проучване *T. denticola* и *P. gingivalis* бяха установени в голям процент от взетите субгингивалните проби от джобове с различна дълбочина (*P. gingivalis* - в 95,8%; *T. denticola* - в 98,2%). Тези патогени са тясно свързани с умерените и дълбоки пародонтални места, но те също така присъстват в по-ниски нива и в плитките пародонтални джобове. Вероятно тези патогени могат да съществуват в малки количества дори в плитките пародонтални места, да пролиферират в резултат на възпалителния процес, и да се размножават в благоприятна за тях среда с достатъчно налични хранителни вещества и на фона на нарушения интегритет на епителните клетки. Знае се, че в дълбоките пародонтални джобове тези условия са по-благоприятни за бактериите. Това може до известна степен да обясни по-високи нива на откритите пародонтопатогени в по-дълбоките пародонтални джобове.

В нито едно от изследваните пародонтални места не се установи наличието на *A. actinomycetemcomitans*. Позовавайки се и на литературните данни за микробната етиология на пародонталните заболявания можем да приемем, че този микроорганизъм се смята за по-тясно свързан с агресивните и рефрактерните пародонтити, отколкото с хроничния пародонтит. Нашите резултати също потвърждават тези схващания.

Количеството на изследваните бактерии се характеризира с по-ниски нива в плитките джобове и се повишава паралелно с увеличаване на дълбочината на джоба.

Таблица 9. Пародонтопатогени при различна дълбочина на пародонталните джобове.

МИКРООРГАНИЗМИ (брой)	n	\bar{X}	SD
A.a. ≤ 4 mm, 4 – 6 mm, >6 mm	20	0	0
<i>P. gingivalis</i> ≤ 4 mm	20	90920,00	181159,87
<i>P. gingivalis</i> 4 – 6 mm	20	288750,50	597514,48
<i>P. gingivalis</i> > 6 mm	20	522025,00	647118,45
<i>T. denticola</i> ≤ 4 mm	20	56045,00	57772,95
<i>T. denticola</i> 4 – 6 mm	20	140930,00	194928,60
<i>T. denticola</i> > 6 mm	20	698250,00	1328814,86
Общ брой микроорганизми в пробите ≤ 4 mm	20	48070000,00	84774481,64

Общ брой микроорганизми в пробите 4 – 6 mm	20	33970000,00	39995251,03
Общ брой микроорганизми в пробите > 6 mm	20	103490000,00	156556029,65

Представените на таблица 9 данни показват, че:

- Най-голям брой пародонтопатогени и от двата вида - *P. gingivalis* и *T. denticola*, са идентифицирани при джобовете, които са **по-дълбоки от 6 мм**;
- **Общият бактериален товар** показва най-високи стойности също при джобовете с най-голямата изследвана дълбочина – **>6мм**.
- Нивата на изследваните пародонтопатогени са **най-ниски** в джобове с дълбочина **< 4 мм**.

От таблица 10 става ясно, че:

- Джобовете с дълбочина между **4 и 6 мм** демонстрират най-голям среден относителен дял на *P. gingivalis*, докато тези с дълбочина над 6 мм са с най-голям среден относителен дял на *T. denticola*.
- Джобовете с дълбочина **< 4мм** показват най-малък среден относителен дял и на двата вида микроорганизми - *P. gingivalis* и *T. denticola*.

Таблица 10. Преваленция на изследваните микроорганизми.

Микроорганизми	Средно аритметична	Стандартна грешка
% <i>P. gingivalis</i> ≤ 4 mm	0.72	0.07
% <i>P. gingivalis</i> 4÷6 mm	1.45	0.74
% <i>P. gingivalis</i> > 6 mm	1.28	1.15
% <i>T. denticola</i> ≤ 4 mm	0.50	0.44
% <i>T. denticola</i> 4÷6 mm	0.76	0.07
% <i>T. denticola</i> > 6 mm	1.50	1.43

От таблицата се вижда, че при изследваните пациенти с умерен и тежък пародонтит *Pg* превалира в умерено дълбоките (4-6 мм) и дълбоките пародонтални джобове (>6 мм). За *Td* най-показателна е преваленцията при дълбоките пародонтални джобове (>6 мм).

При изследването на общия брой микроорганизми във връзка с различна дълбочина на сондиране се установява, че средният общ брой микроорганизми при джобове с дълбочина над **6 мм** е сигнификантно по-голям от този при джобове с по-малка дълбочина (таблица 11).

Таблица 11. Общ брой микроорганизми (МО) в зависимост от дълбочината на пародонталния джоб (PD).

Общ брой МО PD	n	\bar{X}	SD
Дълбочина на сондиране < 4 mm	20	48070000,00 ^a	84774481,64
Дълбочина на сондиране 4 – 6 mm	20	33970000,00 ^a	39995251,03
Дълбочина на сондиране > 6 mm	20	103490000,00^b	156556029,65

На таблицата е показана установената значима разлика за общия бактериален брой при дълбоките пародонтални джобове.

* - еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава (**p<0,05**)

Във връзка с поставената цел е анализирана разликата в количеството ***T. denticola*** в джобовете с различна дълбочина –< 4 мм, 4-6 мм и > 6 мм. (таблица 12).

Таблица 12. Сравнителен анализ на разпределението на *T. denticola* според дълбочината на джобовете.

<i>T. denticola</i> PD	n	\bar{X}	SD
Джоб < 4 mm	20	56045,00 ^a	57772,95
Джоб 4 – 6 mm	20	140930,00 ^a	194928,60
Джоб > 6 mm	20	698250,00^b	1328814,86

От таблицата се вижда установената статистически значима разлика за количеството на *Td* в групата на дълбоките пародонтални джобове (>6мм).

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$).

Резултатите, представени на таблица 12 показват, че:

- Средният брой *T. denticola* (количество) при джобове с дълбочина над 6 мм е сигнификантно по-голям от този при джобовете с по-малка дълбочина;
- Няма установена статистически значима разлика в преваленцията на *T. denticola* (%) в джобовете с различна дълбочина.

Таблица 13. Сравнителен анализ за количеството на *P. gingivalis* според дълбочината на джобовете.

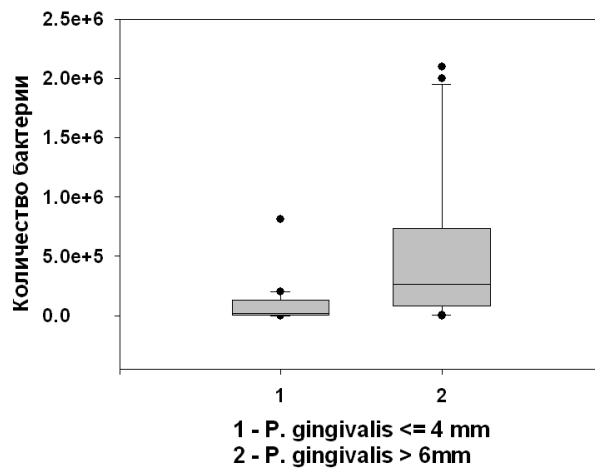
PD \ <i>P. gingivalis</i>	n	\bar{X}	SD
Джоб < 4 mm	20	90920,00 ^a	181159,87
Джоб 4 – 6 mm	20	288750,50 ^{ac}	597514,48
Джоб > 6 mm	20	522025,00 ^{bc}	647118,45

* - еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Данните на таблица 13 показват, че:

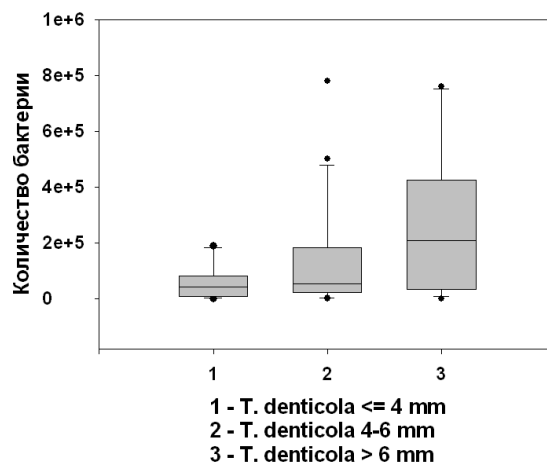
- Средният брой на пародонтопатогените от вида *P. gingivalis* (количество) при джобове с дълбочина над 6 мм е сигнификантно по-голям от този при джобове с дълбочина под 4 мм;
- Няма установена статистически значима разлика в преваленцията на *P. gingivalis* (%) при различните дълбочини на джобовете.

Фигура 7. Разпространение на *P.gingivalis*.



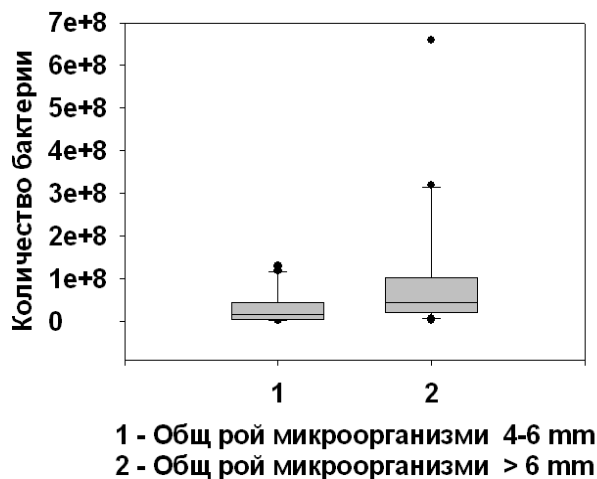
Фигурата показва, че количеството на този микроорганизъм в пробите с **PD>6мм** е статистически значимо по-голямо от количеството в пробите с **PD<4мм**.

Фигура 8. Разпространение на *T.denticola*.



Фигурата показва статистически достоверна разлика при детекцията на *T.denticola* в пробите от пародонтални джобове с дълбочина на сондиране над 6мм в сравнение с пробите от джобовете с дълбочина 4-6мм и с дълбочина <4мм.

Фигура 9. Разпространение на общия бактериален товар.



Фигурата показва, че са установени статистически значими разлики в общия брой микроорганизми между пробите с PD>6мм и тези от по-малки стойности на дълбочина на джоба при сондиране.

Резултати по под-задача 2.2. Пълен пародонтопатогенен спектър основни пародонтопатогени при дълбоки пародонтални джобове (9 контролни щама: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis*) във връзка с тежестта на пародонтита.

Оценка на клиничните и рентгенографски характеристики на изследваната група:

- Изследвани са 20 пациенти, диагностицирани клинически и рентгенографски с тежък хроничен пародонтит, от които 8 мъже и 12 жени, 12 пушачи и 8 непушачи. Средната възраст на участниците в проучването е $47,55 \pm 6,42$ години - в интервала между 37 и 59 години. Процентът на свободните от плака повърхности (HI %): е средно 2,12% при стандартна грешка 3,79.

Таблица 14. Клинични и рентгенографски данни по под-задача 2.2.

Показатели	Средно аритметична	Стандартно отклонение
PBI Average	2,25	0,53
PDmm Av	4,14	0,60
PD ≤ 4 мм / по места	69,20	18,31
PD 4-6 мм /по места	51,30	13,22
PD >6 мм /по места	26,25	17,71
CAL	4,80	1,23
Bone loss	3,26	0,51

От представените данни на таблица 14 можем да обобщим:

- **PBI** (Papillary bleeding index) – кървене на гингивалната папила: средни стойности (определят тежестта на възпалението) - 2,25, което показва умерено гингивално възпаление;
- **PD** (pocket depth) – дълбочина на джоба при сондиране: 4,14 мм, което показва преобладаване на умерено дълбоки пародонтални джобове;
- **CAL** (clinical attachment loss) – загуба на клиничен аташман: средно 4,80 мм, което означава, че преобладават пациенти с тежък пародонтит;
- **Bone loss** – костна загуба: средно 3,26 мм, което показва умерена костна загуба.

Таблица 15. Присъствие и количество на изследваните пародонтопатогени по под-задача 2.2.

Описателна статистика	Средно аритметична	S
Общ брой микроорганизми	384675000,00	100000000,00
Pg	583100,00	340000,00
Aa	0	0
Td	705905,00	340000,00
Tf	554345,00	315000,00
Pi	455195,00	200000,00
Pm	157825,00	71000,00
Fn	30696,50	3550,00

En	16815,29	1800,00
Cg	107474,50	36500,00

На таблица 15 е представен общия брой микроорганизми в средни стойности, данните за идентифицираните микроорганизми при изследваните пациенти са представени като абсолютни стойности. Данните показват присъствието на значими пародонтопатогенни микроорганизми в субгингивалната плака при пародонтални джобове с дълбочина над 6 мм в повишени нива. За *Pg*, *Td*, *Tf*, *Pi*, *Pm*, *Cg* средните стойности са $> N \times 10^5$. Общият брой микроорганизми е средно $3,8 \cdot 10^8$. Не получихме данни за присъствие на *Aa* в субгингивалните проби при настоящото изследване.

Таблица 16. Преваленция на пародонталните патогени.

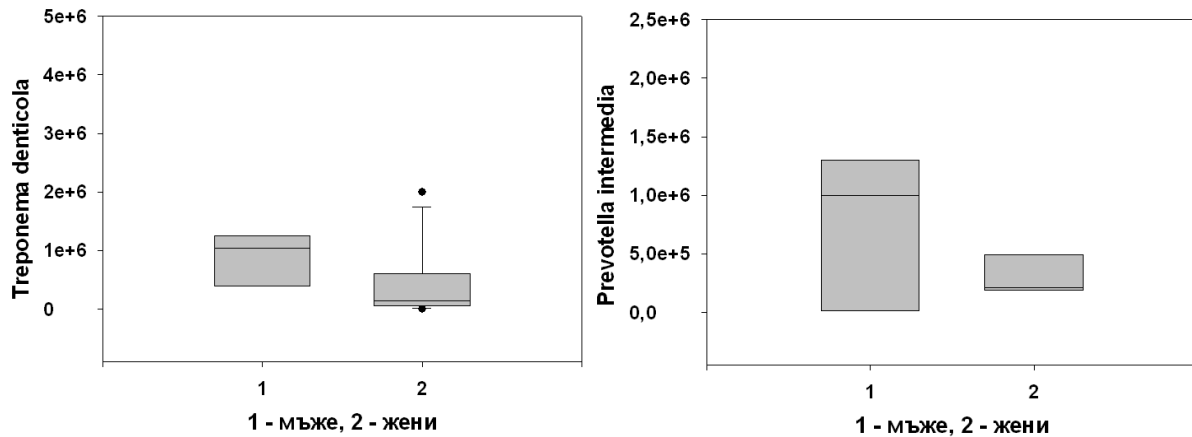
Микроорганизми	Средно аритметична	Средна грешка
Aa%	0	0
Pg%	1,31	0,25
Td%	0,59	0,25
Tf%	0,44	0,19
Pi%	0,32	0,26
Pm%	0,17	0,04
Fn%	0,05	0,00
En%	0,01	0,00
Cg%	0,08	0,06

На таблицата е показана преваленцията на основните пародонтални патогени като *Pg* се установява с най-голяма честота, с по-умерена – *Td*, *Tf* и *Pi*, с по-слаба – *Pm*, *Cg*, *Fn* и *En*. Патогенът *Aa* не беше идентифициран при настоящото изследване.

Резултати, свързани с получени достоверни статистически различия

1) Достоверни разлики между изследваните микробиологични параметри и пола на пациентите

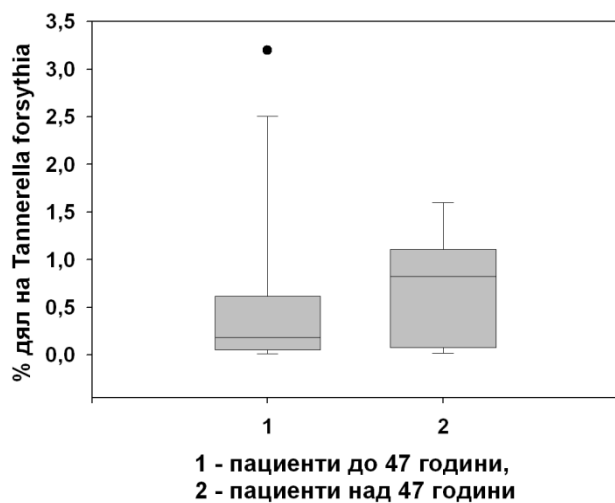
Фигури 10 и 11. Количества на *Treponema denticola* и *Prevotella intermedia* в зависимост от пола.

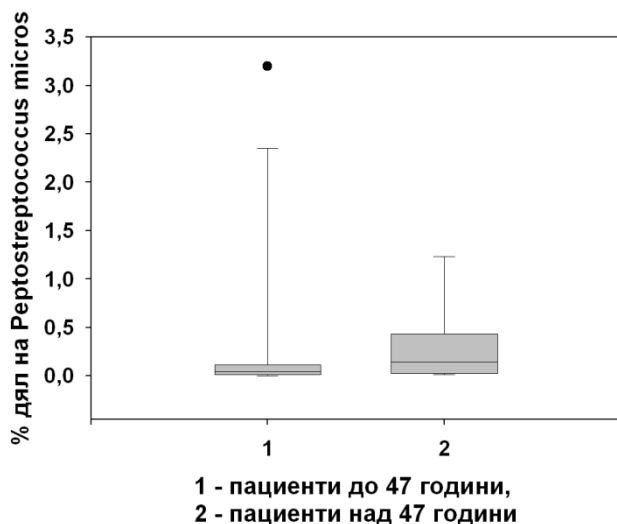


Количеството на *Treponema denticola* ($P=0,05$) и *Prevotella intermedia* ($P=0,07$) показват достоверни различия в зависимост от пола на пациентите. При мъжете количествата и на двата вида бактерии (микробиологични параметри) са значително по-високи в сравнение с тези при жените и стойностите варират в по-широки граници.

2) Влияние на възрастта върху параметрите на пародонтита

Фигури 12 и 13. Преваленция на *Tannerella forsythia* и *Peptostreptococcus micros* в зависимост от възрастта (две групи).





При условие, че разделим изследваните пациенти на две групи в зависимост от възрастта (на базата на медианата, 1-ва група – под 47 години, 2-ра група – над 47 години) установяваме различия единствено по отношение на процентния дял на *Tannerella forsythia* и *Peptostreptococcus micros* (микробиологичен параметър). При пациентите с възраст над 47 години процентният дял на тези бактерии е по-висок като в същото време варира в по-висока степен (фигура 12 и фигура 13).

Резултати с графично представени средни стойности на клиничните, рентгенографски и микробиологични параметри – хистограми – Приложение 5.

Хистограмата на фигура 1 в приложение 5 показва, че средната възраст на изследваните пациенти с тежък хроничен пародонтит (по изпълнението на под-задача 2.2.) е 47,55 години при стандартно отклонение (SD) 6,42.

Хистограмите на фигури 2 и 3 в приложение 4 представят хигиенния статус и свързаното с количеството на плаката гингивално възпаление (тежест). Вижда се, че при по-голямата част от пациентите с тежък хроничен пародонтит стойностите на индекса за свободните от плака повърхности са близки до нула. Средната стойност на хигиенния индекс при пациентите в изследването е 2,12% при 3,79 SD. Логично гингивалното възпаление показва групиране на стойностите при степен 2 и отговаря на 2,25 по използвания за оценка на гингивалното възпаление индекс (РВІ 0-4) при 0,53 SD.

Представените на фигура 4 в приложение 5 данни за средната дълбочина на джоба показват че най-много от пациентите имат средна дълбочина на сондиране е 4,2мм, но преобладаващата част от пациентите имат средна дълбочина на сондиране, близка до 5мм.

На фигури 5, 6 и 7 в приложение 5 е представена характеристика на изследваната група по процентното присъствие на пародонтални джобове с класифицирана дълбочина като близка до нормалната (PD<4мм), умерена (PD 4-6мм) и голяма дълбочина на джоба (PD>6мм).

Фигури 8 и 9 в приложение 5 характеризират изследваната група пациенти по средната загуба на аташман и кост. От хистограмата на фиг.8 се вижда, че средната стойност на загубата на аташман при пациентите, включени в изследването, е 4,80мм при 1,23 SD. От хистограмата на фиг.9 става ясно, че средната стойност на установената рентгенографски костна загуба при изследваните пациенти с хроничен пародонтит е 3,26мм при 0,51 SD.

На фигури 10-26 в приложение 5 са представени получените резултати в настоящото проучване при идентификацията на изследваните пародонталните патогени (по критериите: количество и преваленция(дял)). Бяха установени повишени нива на изследваните пародонтопатогени в субгингивалната среда при пациентите с хроничен пародонтит: общ брой микроорганизми – ср.4.0x10⁸, *Porphyromonas gingivalis* ср.6.0x10⁵, *Treponema denticola* ср.7.4x10⁵, *Tannerella forsythia* ср.6.0x10⁵, *Prevotella intermedia* ср.7.0x10⁵, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros* ср.2.0x10⁵, *Fusobacterium nucleatum* ср.4.0x10⁴, *Eubacterium nodatum* ср.2.0x10⁴, *Capnocytophaga gingivalis* ср.1.0x10⁴. Данните за количествата на изследваните микроорганизми показват значимост на нивата на *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, и *Peptostreptococcus micros* в субгингивалното пространство при хроничен пародонтит*. Данните за преваленцията показват значимост на присъствието на *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Prevotella intermedia* в субгингивалното пространство при хроничен пародонтит*. Повишените нива на *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia* се асоциират строго с прогресията на хроничния пародонтит и елиминирането им в хода на лечението се свързва с подобряване на клиничните показатели.

*терапевтично значим бактериален брой и дял!

Анализ на корелационната зависимост между изследваните видове
бактерии и общия брой микроорганизми

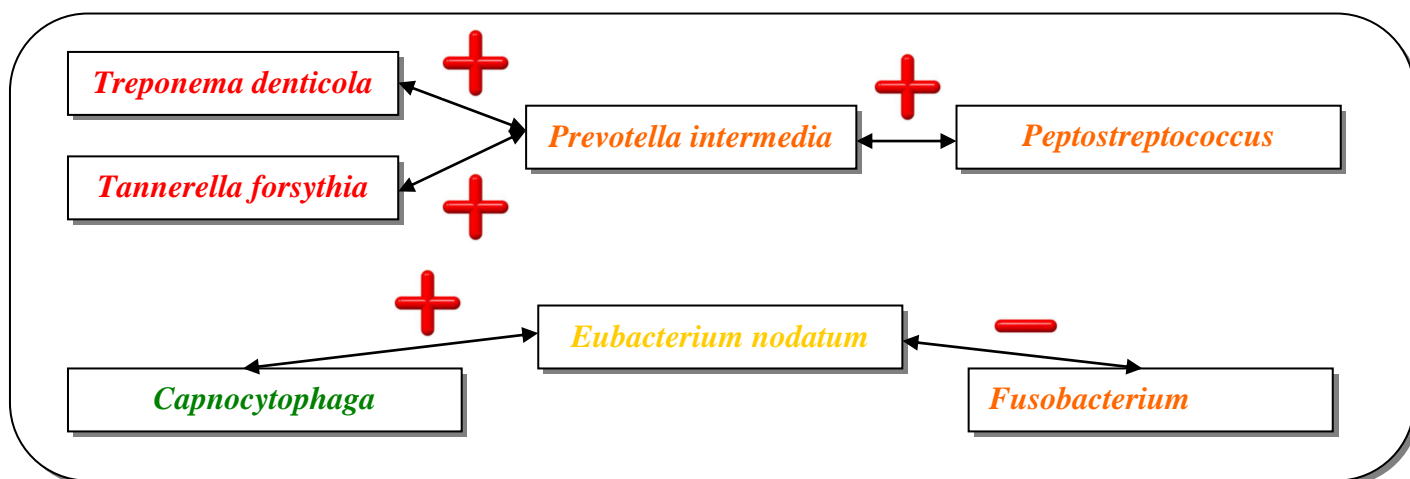
Фигура 14. Установени в изследването взаимовръзки между общата
бактериална маса и изследваните микроорганизми.

- ОБМ + (N) *Tannerella forsythia* (R=0,46)
- (%) *Porphyromonas gingivalis* (R=-0,71)
- *Peptostreptococcus micros* (R=-0,60).

Общият брой микроорганизми показва значима правопрпорционална зависимост единствено с *Tannerella forsythia* (R=0,46) и по-силна обратнопропорционална взаимовръзка с процентния дял на *Porphyromonas gingivalis* (R=-0,71) и *Peptostreptococcus micros* (R=-0,60). Т.е. При пациенти с малък общ брой микроорганизми се наблюдава малък брой на *Tannerella forsythia* и увеличен процентен дял на *Porphyromonas gingivalis* и *Peptostreptococcus micros*.

Взаимовръзка между изследваните видове бактерии

Фигура 15. Установени значими взаимовръзки между количествата на изследваните видове бактерии при проведен рангов корелационен анализ (Spearman). С положителен знак са представени положителните корелационни коефициенти, а с отрицателен знак са означени отрицателните корелационни коефициенти.



Корелации между изследваните видове бактерии и дълбочината на пародонталните джобове

Единствената установена значима взаимовръзка бе между **PD 4-6 mm** и броя на *Capnocytophaga gingivalis* (R=501). Тъй като това е микроорганизъм, свързан предимно със състоянието на пародонтално здраве и съответно плитки пародонтални джобове, намираме получените резултати за потвърдителни по отношение на съвременната литература като не свързваме присъствието му с дълбоките пародонтални места.

Корелации между загубата на кост (Bone Loss, mm) и изследваните клинични и микробиологични параметри на пародонтита

Таблица 17. Значими корелации между изследваните параметри.

Bone Loss, mm	Показател	Корелационен коэффициент (R), при P<0,05
		Общ брой микроорганизми
	% дял на <i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,487
	% дял на <i>Tannerella forsythia</i>	0,546
	% дял на <i>Peptostreptococcus(Micromonas) micros</i>	0,519
	HI %	-0,648
	PD mm средно	0,523
	PD 4-6mm	0,545
	CAL	0,570

Костната загуба показва значими взаимовръзки с голям брой от изследваните показатели – присъствието на плака, дълбочината на джобовете, загубата на аташман и присъствието на основни пародонтопатогени в пародонталната среда.

Корелации между дълбочината на джоба (PD mm средни стойности) и изследваните параметри на пародонтита

Таблица 18. Значими корелации на средната дълбочина на джоба с други параметри на пародонтита.

PD mm средни стойности	Показател	Корелационен коефициент (P<0,05)
	% дял на <i>Tannerella forsythia</i>	0,469
	CAL	0,721
	Bone loss, mm	0,523

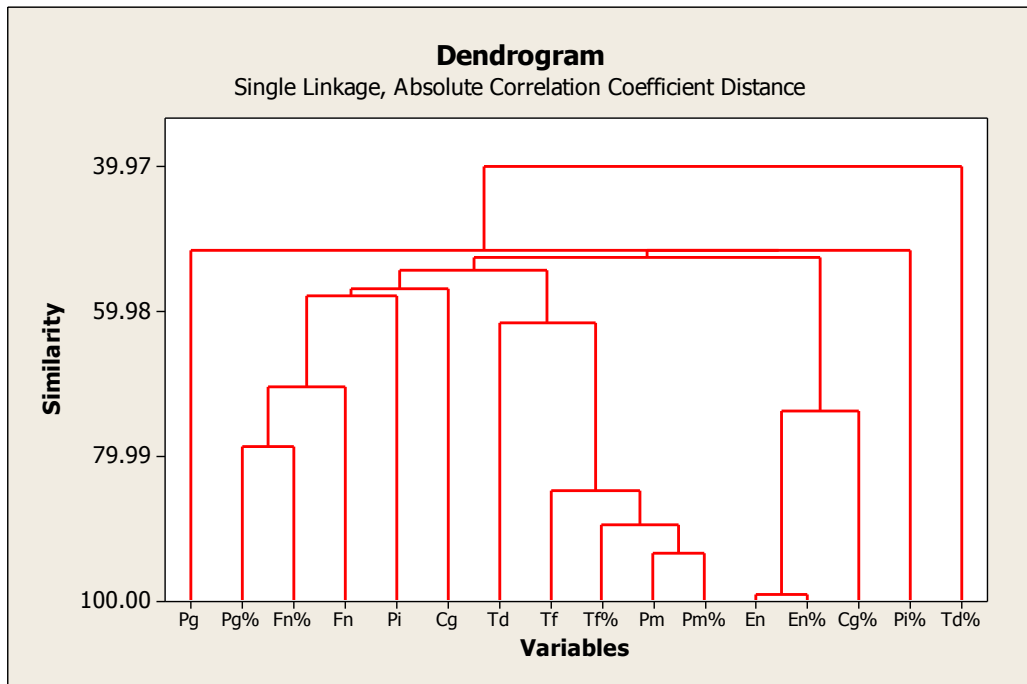
От таблицата се вижда, че дълбочината на джоба корелира статистически достоверно със загубата на аташман (0,721 – силна връзка), загубата на кост (0,523 – значима връзка) и преваленцията на *Tannerella forsythia* (0,469 – умерена връзка).

Резултати за междубактериалните връзки след клъстерен анализ

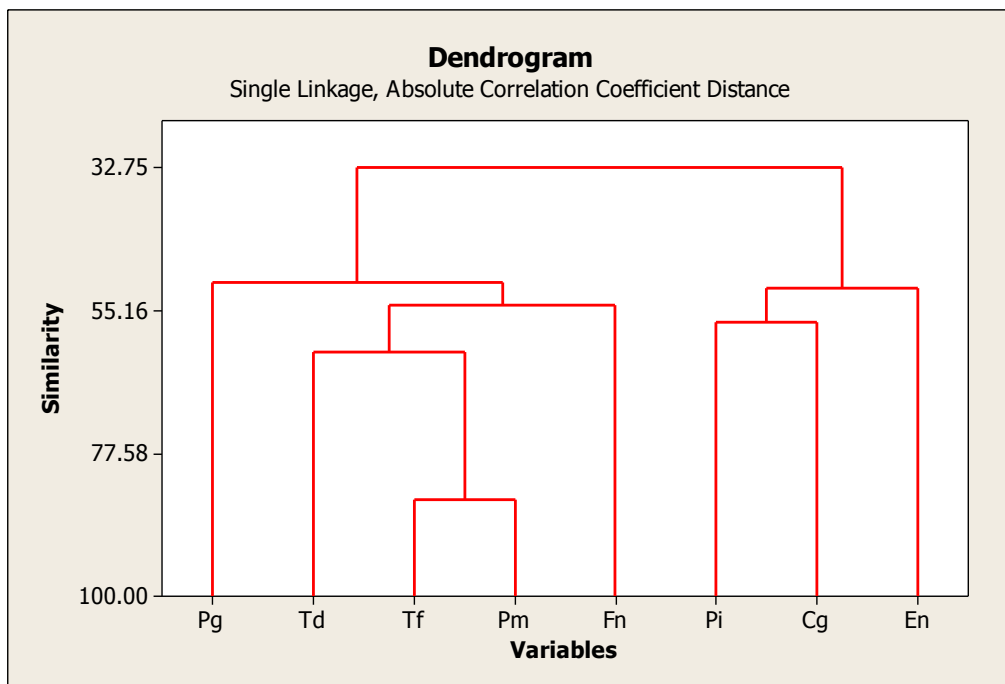
Забележка: За да се проведе клъстерен анализ на резултатите от настоящото изследване е необходимо да има идентифицирана бактериална находка за всички пациенти за всеки един от изследваните пародонтопатогени. Поради това, че при 9 от пациентите някои от изследваните микроорганизми не са идентифицирани, те са изключени от анализа и анализът е извършен с данните от 11 пациента. Това води и до известни различия спрямо резултатите, получени при корелационния анализ, които се базират на данните от всички 20 пациента!

Резултатите от този анализ са представени като дендрограми на следващите фигури - фигура 16 и фигура 17.

Фигура 16. Дендрограма с корелационни разстояния, отразяваща взаимовръзката между изследваните видове бактерии и процентните им дялове в микробното съобщество.



Фигура 17. Дендрограма с корелационни разстояния, отразяваща взаимовръзката между изследваните видове бактерии.



На базата на този вид анализ в настоящото изследване получихме резултати, които позволяват обособяването на 2 основни групи от микробни видове:

1 група: Tf – Pm – Td – Fn – Pg (Представители на червения и оранжевия комплекс)

2 група: Pi – Cg – Ep (Представители на оранжев, оранжево-асоцииран и зелен комплекс)

Получаваните резултати потвърждават литературни данни за асоциациите на *P.gingivalis* с микроорганизми от червения и оранжевия комплекси на Sokransky и по-специално: *Tf*, *Fn*, *Td*. Тези микроорганизми взаимно усилват своите растеж, вирулентност и активност, което обуславя по-висока степен на тъканна деструкция. Направеният анализ и групирането на пародонтопатогените в това проучване е в подкрепа на синергични отношения на изолираните микроорганизми и е в съответствие с доказателствата в литературата за здравата им връзка с патогенезата на пародонталните заболявания. От друга страна е известен инхибиторен ефект на *P.gingivalis* спрямо *P.intermedia*, което може да е обяснение за връзката, установена при проведеното от нас изследване между *P.intermedia* и *C.gingivalis* и *E.nodatum*. *C.gingivalis* попада в зеления комплекс на Sokransky, който се свързва със състоянието на пародонтално здраве, но макар и по-рядко, се съобщава да е бил изолиран и от места с развита пародонтална лезия.

Резултати за взаимовръзките на клинични и микробиологични параметри след проведен принципен компонентен анализ (PCA)

До голяма степен този анализ дава подобна информация на тази, получена от клъстерния анализ. С помощта на представените фигури може да лесно да се онагледят каква е взаимовръзката между изследваните показатели. Колкото по-близо са стрелките една до друга, толкова по-силна е взаимовръзката между показателите като зависимостта е право пропорционална. Когато ъгълът между тях е около 180 градуса, това означава, че има обратно пропорционална зависимост! На фигура 19 може да се види групирането на пациентите на базата на включените показатели като тяхното разположение в двуизмерното пространство се определя от стойността на конкретните

показатели – всеки показател измества точката в посока на стрелката от предишната фигура като конкретното разположение се определя от едновременното въздействие на включените в анализа показатели.

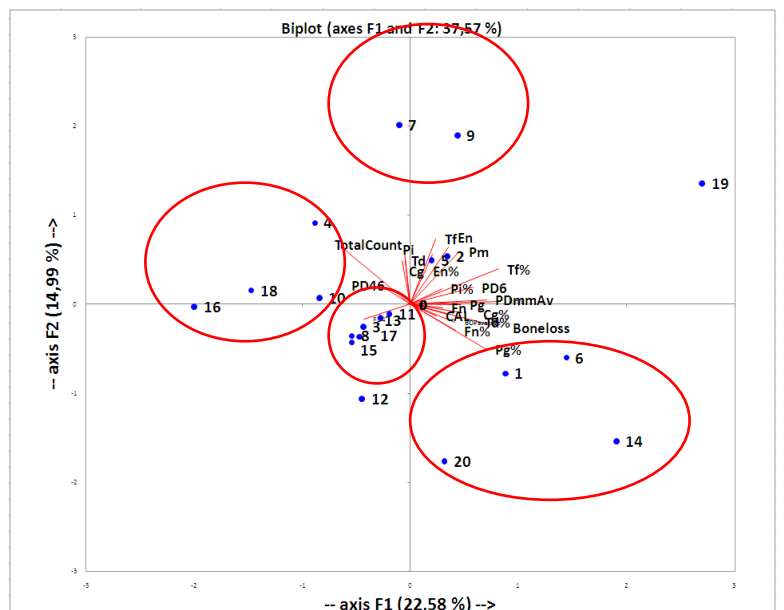
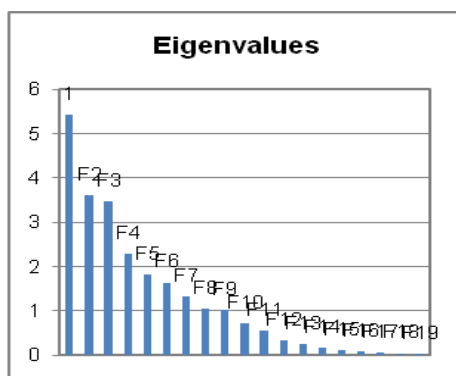
В този вид анализ за разлика от клъстерния анализ са включени данните от всички 20 пациента. Затова има известни различия спрямо клъстерния анализ. Отчасти тези различия се дължат и на алгоритъма на изчисление. Тъй като са включени и 20-те пациента, то номерът на пациента съответства на реда в първоначалния документ (таблица 19).

Таблица 19. Представяне на пациентите по поредните им номера на включване в изследването.

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
пациент	И.Д.	Д.Б.	Т.Т.	В.Г.	С.Д.	Е.Б.	С.М.	А.А.	А.П.	М.Г.	М.М.	И.М.	Р.Д.	С.И.	Ас.Ас.	К.К.	В.Т.	И.И.	С.О.	Е.Д.

РСА на всички изследвани показатели с усреднени стойности

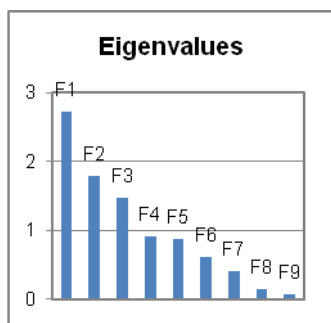
Фигури 18 и 19. Принципен компонентен анализ на всички показателя включени в изследването.



При включване на всичките 24 изследвани показателя първите две аксиси включват 37,57 % от общата инертност. От статистическа гледна точка трябва да се вземат предвид само първите две аксиси (F1 и F2), което е в съответствие с целите на прилагания анализ (PCA). От схемата става ясно, че е налице **силна до умерена правопрпорционална зависимост между показателите: CAL, Bone Loss, PD средно, PD >6mm, BoP, Pg, Fn, Pg%, Fn%, Tf%, Pi%, Td%**. Групата от показателите: CAL, Bone Loss, PD средно, PD >6mm, BoP, **Pg, Fn, Pg%, Fn%, Td%** показват силна до умерена обратнопропорционална зависимост с друга група от показатели: PD <4мм, PD 4-6мм, **Pi, Td, Tf, Cg, En**. Също така пародонтопатогените **En** и **Cg** **показват силна правопрпорционална зависимост помежду си**, и от своя страна са в обратнопропорционална зависимост спрямо **Fn**.

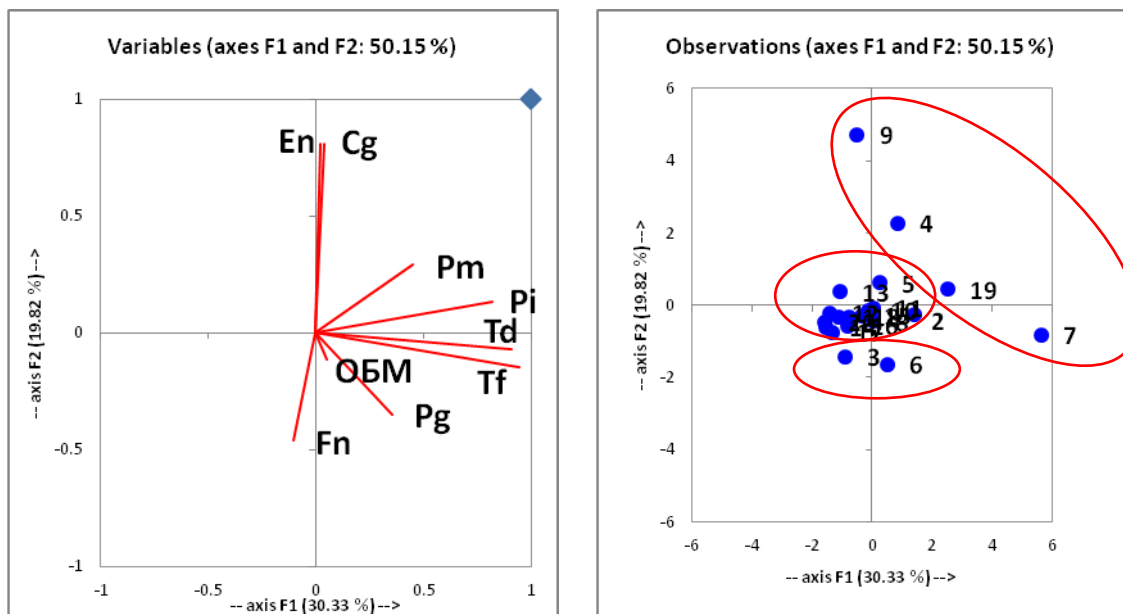
PCA на изследваните групи бактерии

Фигура 20. Изследване на микробиологичните показатели по факториални оси: от F1 до F9.



При включване на 9 микробиологични показатели първите две аксиси включват 50,15 % от общата инертност. В този случай отново, в съответствие с изискванията на теста, са анализирани първите 2 факториални оси.

Фигури 21 и 22. Принципен компонентен анализ на микроорганизмите, включени в изследването. В изследваните пародонтални места при настоящото проучване не се установи наличието на *A. Actinomycetemcomitans*. Затова този показател не е включен в анализа.



За да бъдат разграничени пациентите и групите от пациенти в зависимост от изследвания комплекс от микробиологични показатели, бе проведен принципен компонентен анализ (PCA). Pm, Pi, Td, Tf, Pg и ОБМ (обща бактериална маса) показват добра взаимовръзка помежду си като допринасят основно за формирането на първата аксиса. Втората аксиса се формира основно на базата на En, Cg и Fn като първите два вида бактерии имат силна правопрпорционална зависимост помежду си, а Fn – обратнопропорционална спрямо останалите два.

Резултати по под-задача 2.3. Субгингивално и орално присъствие на *Candida albicans* при хроничен пародонтит.

Таблица 20. Работни данни за параметрите в изследването.

Описателна статистика	Средно аритметична	Стандартно отклонение
Общ брой <i>Candida</i> (пародонтален джоб)	48100.00	54632.59
<i>Candida albicans</i> (Ca) (пародонтален джоб)	8557.50	15628.81
Общ брой <i>Candida</i> (гърба на езика)	19203.75	33502.99
<i>Candida albicans</i> (Ca) (гърба на езика)	5001.67	9384.23

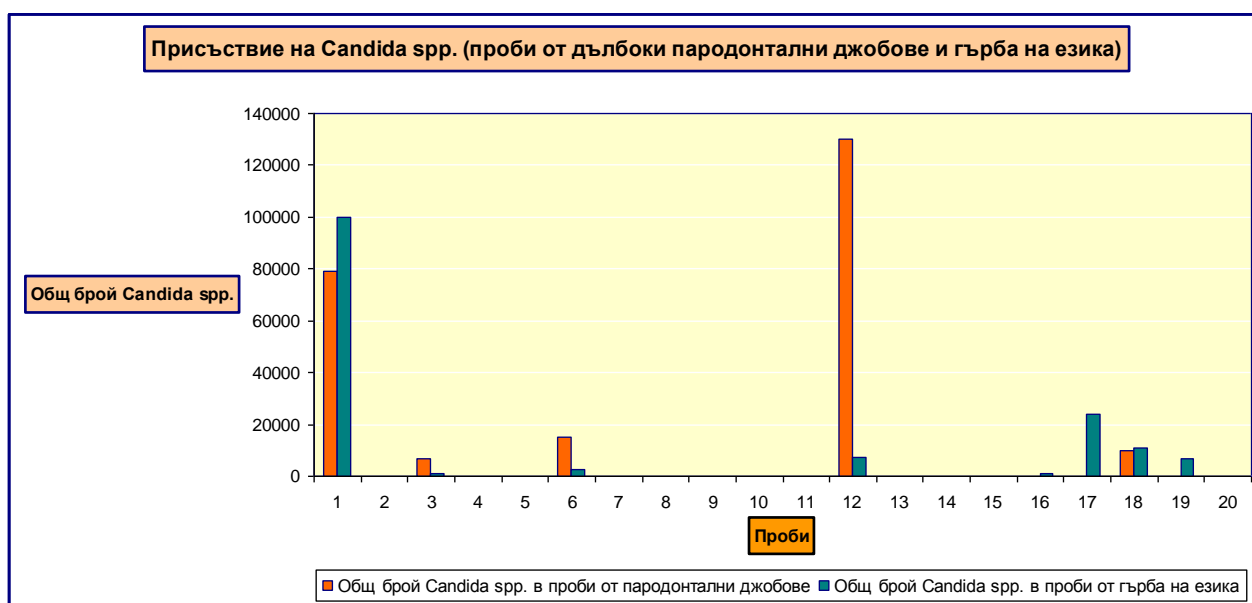
На таблицата са показани получените данни за идентификацията на *Candida* при пациентите с хроничен пародонтит.

Таблица 21. Разпространение на параметрите в изследването.

Описателна статистика	Средно аритметична	Ст. грешка
дял % <i>Candida albicans</i> (пародонтален джоб)	11.44	9.98
дял % <i>Candida albicans</i> (гърба на езика)	37.17	34.59

Резултатите, получени при нашето изследване по отношение на детекцията на *Candida albicans* в пародонтални джобове, показаха присъствие при 4 от 20 пациента (три: $N \times 10^2$, един: $N \times 10^4$). С това данните се доближават до тези, получени при проучванията на Masako 2003 (109). Както и в този случай, макар и да има находка, тя не е със статистическа значимост.

Фигура 23. Установено присъствие на *Candida spp.* в дълбоките пародонтални джобове и оралната мукоза при пациенти с хроничен пародонтит.



Резултатите, получени при нашето изследване по отношение на детекцията на *Candida albicans* по орална лигавица – гърба на езика, показаха, че *C. albicans*

присъства при 6 от изследваните 20 пациента с пародонтит в количество $N \times 10^2$ до $N \times 10^4$; *C. glabrata* присъства в една от взетите проби ($N \times 10^4$); *C. parapsilosis* – само в една проба ($N \times 10^3$). Резултатите нямат статистическа достоверност. Те са представени графично на фигура 23.

Резултати по задача 3. Да се оцени генната експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- α)) при тежък хроничен пародонтит.

Резултатите са представени като средно-аритметична стойност и стандартно отклонение за всички количествени показатели (dCt, ddCt, 2-ddCt).

Поставени са следните проблеми:

3.1. Сравнение на генната експресия (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- α)) гингивални тъкани, прилежащи на пародонтални джобове с различна дълбочина и бактериалната находка.

3.1.1. Сравнение на dCt (Ct на гена – Ct на референтния ген) - dCT на IL6 се повишава при по-голяма дълбочина (най-добре се разграничават случаите с > 6 мм).

Аналогично при TNF случаите с дълбочина > 6 мм са с най-високи стойности на dCT.

Таблица 22. Сравнителен анализ на генната експресия при проби, взети от различна дълбочина, изразена като dCt (Ct (ген – Ct (референтен ген - АСТВ))) на IL6 и TNF.

Показател	Дълбочина на джобовете, прилежащи на пробите от гингива									P - коефициент		
	≤ 4 мм			4 – 6 мм			> 6 мм			Paired t-test		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	≤ 4 мм / 4 – 6 мм	≤ 4 мм / > 6 мм	4 – 6 мм / > 6 мм
dCT (IL6)	11	14.5	2.5	10	15.9	4.2	11	16.8	3.4	0.45	0.048*	0.48
dCT (TNF)	16	7.3	3.6	16	7.3	2.6	16	8.6	1.8	0.94	0.11	0.064**

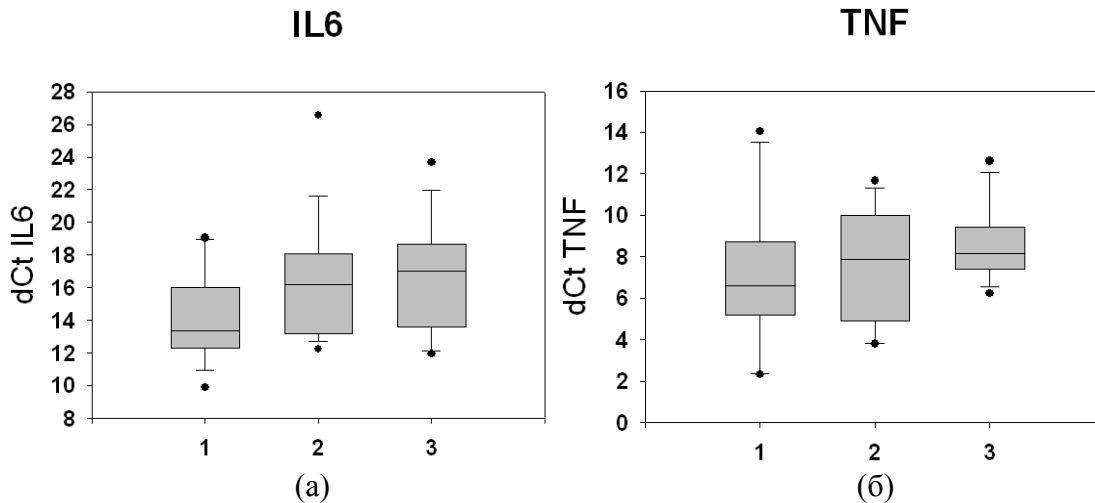
N – брой изследвани пациенти,

\bar{X} - средно-аритметична стойност,

SD – стандартно отклонение

* Статистически достоверните различия са подчертани (P-коефициент < 0.06)

Фигури 24 и 25. dCt на гените (а) IL6 и (б) TNF при (1) PD ≤ 4мм, (2) PD 4–6мм, (3) PD > 6мм.



Значими различия се установяват относно генната експресия (изразена като dCt) на IL6 между пробите взети от местата с плитки и дълбоки джобове (≤ 4 мм и > 6 мм), както на TNF при местата с умерени и дълбоки джобове (4 – 6 мм / > 6 мм).

3.1.2. Сравнение на ddCt

Таблица 23. Сравнителен анализ на генната експресия при проби, взети от различна дълбочина, изразена като ddCt на IL6 и TNF.

Показател	Дълбочина на джобовете, прилежащи на пробите от гингива									P - коефициент		
	(1) dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм)			(2) dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм)			(3) dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм)			Paired t-test		
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	(1) / (2)	(1) / (3)	(2) / (3)
ddCT (IL6)	12	2.05	5.08	10	3.2	2.0	13	0.2	4.8	0.458	0.963	0.233
ddCT (TNF)	17	0.25	2.39	15	1.7	2.4	17	0.98	2.6	0.016*	0.216	0.734

N – брой изследвани пациенти

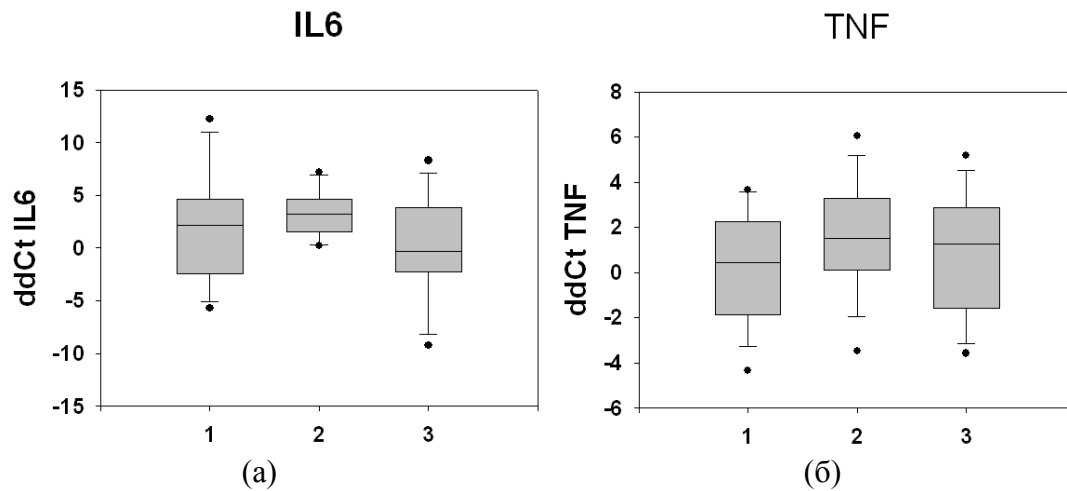
\bar{X} - средно-аритметична стойност

SD – стандартно отклонение

* Статистически достоверните различия са подчертани (P-коефициент < 0.05).

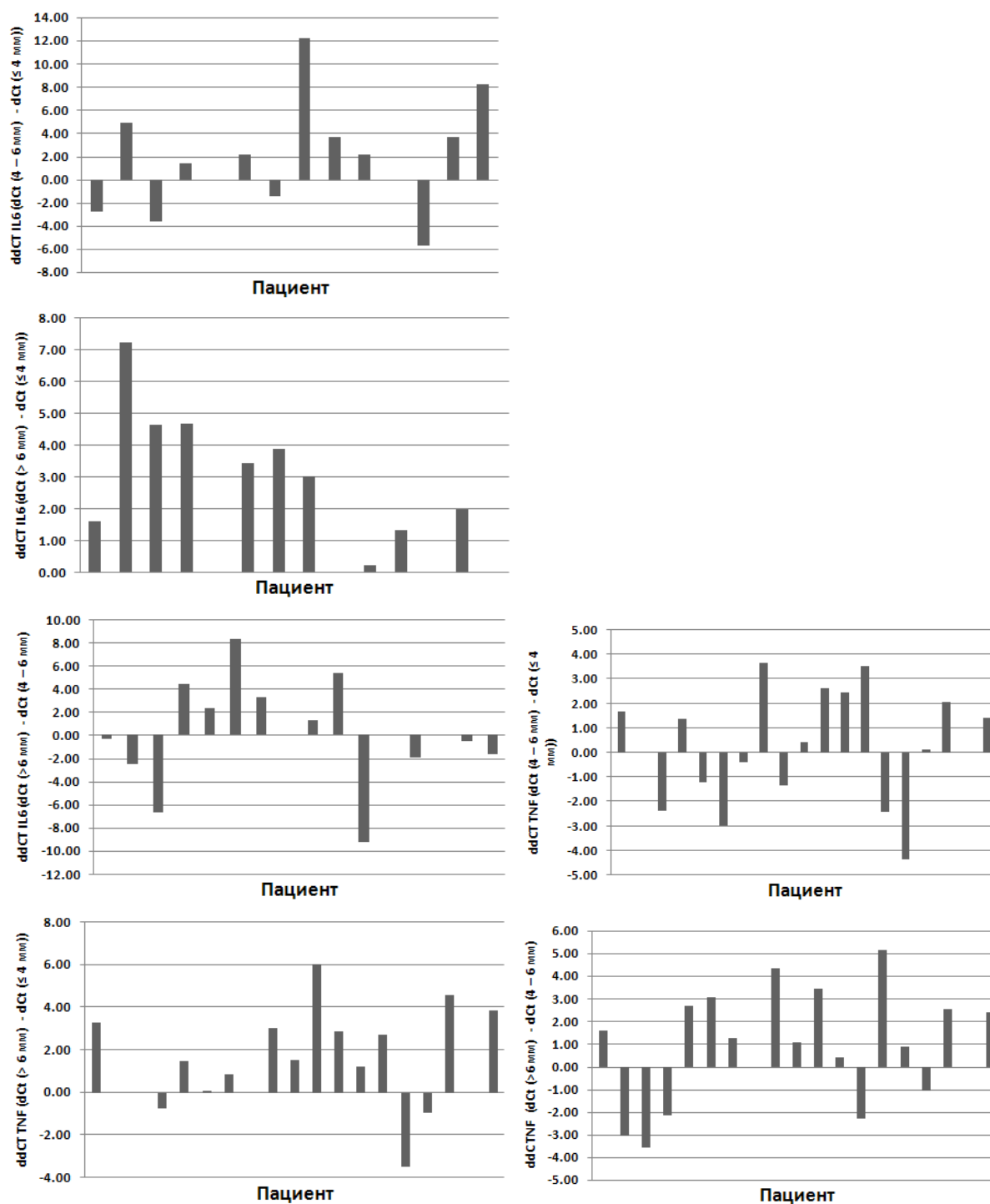
Значими различия се установяват единствено по отношение на генната експресия (изразена като ddCt) на TNF между пробите, калибрирани спрямо местата с най-малката дълбочина на джоба (**PD \leq 4 мм**). (**p=0,016**).

Фигури 26 и 27. Графично представяне на **ddCt** на гените (а) IL6 и (б) TNF при (1) dCt (PD 4 – 6 мм) - dCt (PD \leq 4 мм), (2) dCt (PD> 6 мм) - dCt (PD \leq 4 мм), (3) dCt (PD>6 мм) - dCt (PD 4 – 6 мм) според данните от таблица 23.



Следователно резултатите показват повишена експресия на TNF в гингивалната тъкан, прилежаща на пародонтални джобове с по-голяма дълбочина и се установява зависимост между генната експресия на TNF и дълбочината на джоба при сондиране при пациентите с хроничен пародонтит.

Фигури 28-33. ddCt на гените IL6 и TNF в проби от места с различна дълбочина на джоба при част от пациентите в изследването.



На фигури 28-33 са представени резултатите от генната експресия на изследваните фактори поотделно за изследваните пациенти с хроничен пародонтит.

3.2. Сравнение на генните експресии спрямо тежестта на заболяването, изразена чрез дълбочината на джоба.

Таблица 24. Коефициенти на значимост съобразно генната експресия на изследваните проинфламаторни фактори и дълбочината на джоба.

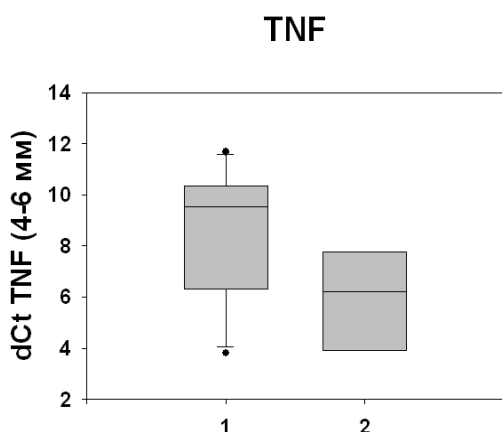
Показател	P – коефициент (t-test / Mann- Whitney U тест)	\bar{X} (умерено- тежък пародонтит)	\bar{X} (тежък пародонтит)
dCt IL6 (≤ 4 мм)	0.094	15.35	12.98
dCt TNF (≤ 4 мм)	0.103	8.4	5.6
dCt IL6 (4 – 6 мм)	0.603	16.7	15.6
dCt TNF (4 – 6 мм)	0.056*	8.6	6.2
dCt IL6 (> 6 мм)	0.637	16.1	17.1
dCt TNF (> 6 мм)	0.247	8.9	7.9
ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.488	1.1	3.3
Степен на промяна IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	1.0	0.2	0.1
ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.188	2.4	4.2
Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.413	0.12	0.05
ddCT IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.161	-0.89	3.6
Степен на промяна IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.160	1.9	0.1
ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.580	-0.02	0.7
Степен на промяна TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.955	0.4	0.7
ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.596	1.2	2.1
Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.244	0.7	0.3
ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.291	0.9	1.9
Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.205	1.4	0.3

При анализ на данните от таблица 24 се установява статистически значима разлика между пациентите с умерен и тежък хроничен пародонтит при **dCt TNF (4 – 6 мм) 0.056 при $p < 0.06$.**

*При случаите с коефициент $P < 0.06$ приемаме, че има достоверни различия.

** В някои случаи се наблюдават сравнително големи различия между средноаритметичните стойности, но не се установяват достоверни статистически различия. Причината за това е, че стандартните отклонения тогава са твърде големи и покриват и средната стойност на другата група пациенти!

Фигура 34. dCt на генната експресия на TNF при пациенти с различна тежест - (1) умерен (2) тежък.

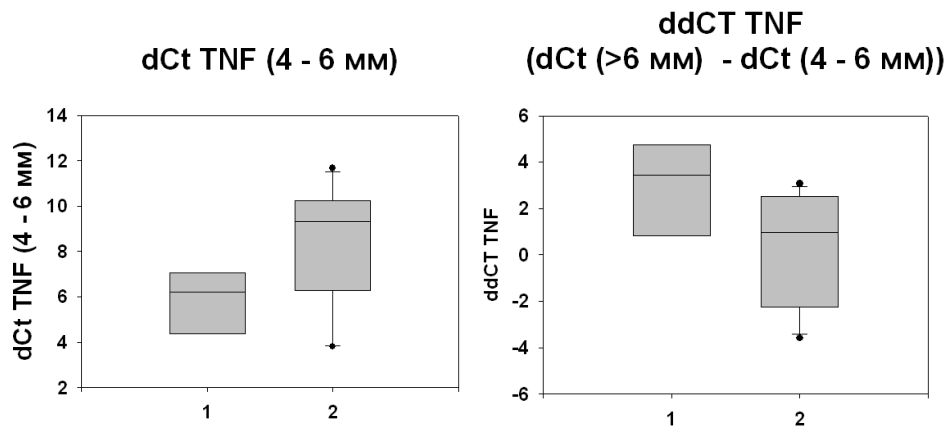


Резултатите за генната експресия на изследваните цитокини във връзка с пола са показани на таблица 25.

Таблица 25. Сравнение на генните експресии в зависимост от пола на пациента (* $p < 0.06$).

Показател	P – коэффициент (t-test / Mann- Whitney U тест)	\bar{X} (мъж)	\bar{X} (жена)
dCt IL6 (≤ 4 мм)	0.418	13.4	14.6
dCt TNF (≤ 4 мм)	0.234	5.6	7.9
dCt IL6 (4 – 6 мм)	0.193	18.4	15.7
dCt TNF (4 – 6 мм)	0.057*	5.8	8.4
dCt IL6 (> 6 мм)	0.894	1.9	3.9
dCt TNF (> 6 мм)	0.429	8.4	8.0
ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.193	4.8	5.0
Степен на промяна IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.325	1.7	0.2
ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.919	3.1	3.2
Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.817	0.17	0.1
ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.510	-1.54	0.65
Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.348	0.3	1.7
ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.942	0.2	0.3
Степен на промяна TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.501	1.3	0.4
ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.132	3.1	1.1
Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.351	0.1	0.4
ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.044*	2.9	0.2
Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.229	0.3	1.3

Фигури 35 и 36. Представена е генната експресия на TNF при пациенти с различен пол при местата с умерена и голяма дълбочина на джоба: (А) dCt и (Б) ddCt (dCt (PD>6 мм) - dCt (PD 4 – 6 мм)) - (1) мъжки пол, (2) женски пол.



Резултатите показват, че има различия в генната експресия на TNF (dCt 4-6 мм) при двата пола при $p=0.044$. Данните показват и статистическа достоверност на разликите в генната експресия на TNF при пациентите с места с различна тежест на пародонтита. При жените и пациентите с умерена тежест на заболяване (показано на фигура 45) dCt на TNF се увеличава ($p<0.07$).

На таблица 26 са показани коефициентите на значимост на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с бактериалната находка и дълбочината на джоба (тежестта на пародонтита).

Таблица 26. Значими взаимовръзки между генната експресия и количествата на изследваните бактерии.

Статистически достоверна взаимовръзка между изследваните показатели		Корелационен коефициент (R)
P. gingivalis 4-6mm	ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.745
	Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.767
T. denticola<4mm	dCt IL6 (> 6 мм)	0.525
	ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.867
T. denticola 4-6mm	Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.817
	dCt TNF (≤ 4 мм)	-0.579
	ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.619
	Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.557
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	-0.533

T. denticola > 6mm	dCt IL6 (> 6 мм)	0.538
	dCt TNF (> 6 мм)	0.544
	ddCT IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.566
Общ брой 4-6мм	Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.545
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	-0.7

Показаните на таблица 26 резултати сочат, че докато броят на *P. gingivalis* на местата с умерена дълбочина на джоба (PD 4-6 мм) и общият брой бактерии на същите места (PD 4-6 мм) корелират с промяната на генната експресия на IL6, броят на *T. denticola* на местата с умерена дълбочина (PD 4-6 мм) корелира с генната експресия и степента на промяна на генната експресия на TNF.

На таблица 27 са показани и коефициентите на значимост на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с кървенето при сондиране и костната загуба (тежестта на пародонтита).

Таблица 27. Значими различия между генната експресия и параметрите BoP и Bone loss.

Статистически достоверна взаимовръзка между изследваните показатели*		Корелационен коефициент (R)
BoP	Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.775
	ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.494
	ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.501
Bone loss mm	ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.526
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	-0.568

* p<0,06

От таблица 27 се вижда, че е установена статистическа значимост между кървенето при сондиране и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-малката дълбочина: PD>6мм спрямо PD<4мм – за интерлевки-6; PD>6мм спрямо PD<4мм и PD 4-6мм спрямо PD<4мм – за TNF. Освен това има статистическа значимост между костната загуба и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-малката дълбочина: PD>6мм спрямо PD<4мм и PD>6мм спрямо PD 4-6мм за TNF.

На таблица 28 са показани коефициентите на значимост на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с различната дълбочина на джоба при сондиране (тежестта на пародонтита). Установени са статистически достоверни корелации между степента на генна експресия на интерлевкин 6 (4-6мм) и степените на промяна на генната експресия на TNF в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране – от дълбоките към плитките места. Установени са също статистически достоверни корелации между степента на генна експресия на **TNF** (>6мм) и (4-6мм), и степените на промяна на генната експресия на **интерлевкин 6** в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране – от дълбоките към плитките места. От таблицата се вижда установената положителна корелация между степените на промяна на нивата на генна експресия на изследваните интерлевкини в дълбоките, средно-дълбоките и плитките пародонтални места.

Таблица 28. Значими различия между генните експресии на IL6 и TNF на местата с различна дълбочина.

Статистически достоверна взаимовръзка между изследваните показатели		Корелационен коефициент (R)
dCt - IL6 (≤ 4 мм)	dCt TNF (> 6 мм)	0.698
dCt - TNF (≤ 4 мм)	dCt TNF (4 – 6 мм)	0.744
	ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.874
dCt - IL6 (4 – 6 мм)	Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.544
	Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	-0.552
dCt – TNF (4 – 6 мм)	ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.68
dCt - IL6 (> 6 мм)	ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.556
dCt - TNF (> 6 мм)	ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	-0.594
ddCt IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.573
	ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.664

* $p < 0.06$

При оценка на едновременното присъствие на двата изследвани цитокина се установяват значими взаимовръзки между генните експресии на IL6 и TNF и показват корелация с дълбочината на сондиране (тежестта на пародонтита).

На таблица 29 е показана установената статистически значима корелация на генната експресия на интерлевкин 6 с възрастта на изследваните пациенти с хроничен пародонтит.

Таблица 29. Значими взаимовръзки между генната експресия на IL6 и възрастта на пациентите.

Статистически достоверна взаимовръзка между показатели		Корелационен коефициент (R)
Възраст	dCt IL6 (4 – 6 мм)	0.698

* $p < 0.06$

Единствено генната експресия на IL6 (PD 4–6 мм) показва връзка с възрастта на пациентите като dCt нараства с увеличаване на възрастта.

Резултати по задача 4. Да се оцени генният полиморфизъм на интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- α) и лимфотоксин алфа (LT- α) при тежък хроничен пародонтит.

Проучването цели откриването на връзка между развитието и тежестта на хроничния пародонтит и присъствието на генен полиморфизъм за определени инфламаторни фактори, описани да са свързани с деструкция на пародонтален аташман. Резултатите, получени в това проучване, са обработени статистически и са представени в табличен и графичен вид.

Оценка на клиничните и рентгенографски характеристики на изследваната група

Направен е подробен дескриптивен анализ с основните изследвани показатели за всички селектирани пациенти в отделните групи: индивиди със здрав пародонт (контролна група), пациенти с умерен пародонтит и пациенти с тежък пародонтит (таблица 30). (Пациенти с лек пародонтит не бяха обект на изследването.)

Таблица 30. Дескриптивен анализ на параметрите на пациентите от отделните групи, включени в изследването: пародонтално здрави, с умерен пародонтит и с тежък пародонтит.

Описателна статистика	Средно аритметична	Медиана	Стандартно отклонение	Обхват	Минимална стойност	Максимална стойност	Брой случаи
Контролна група (диагностичните критерии отговарят на тези, приети за здрав пародонт)							10
Възраст	22,60	23,00	2,84	8,00	18,00	26,00	
Пациенти с умерен пародонтит							12
Възраст	48,50	47,50	9,77	33,00	37,00	70,00	
HI%	10,42	2,50	13,22	30,00	0,00	30,00	
BoPaverage	96,50	100,00	9,03	30,00	70,00	100,00	
PDmmAv	3,28	3,10	0,55	2,10	2,80	4,90	
CAL	3,46	3,40	0,25	0,80	3,10	3,90	
Bone loss	2,18	2,10	0,56	2,10	1,50	3,60	
Пациенти с тежък пародонтит							18
Възраст	50,83	49,00	8,45	30,00	40,00	70,00	
HI%	2,78	0,00	6,00	20,00	0,00	20,00	
BoPaverage	99,28	100,00	2,27	9,00	91,00	100,00	
PDmmAv	4,19	4,00	0,67	2,60	3,50	6,10	
CAL	5,12	5,10	0,99	3,50	3,90	7,40	
Bone loss	3,74	3,40	1,46	5,00	2,00	7,00	

При селектираните пациенти са анализирани клиничните параметри, приети за рутинна диагноза на пародонтита: хигиенен индекс (HI); кървене при сондиране (BoP); дълбочина на джоба при сондиране в мм (PPD); загуба на аташман в мм (CAL) и също степента на костната загуба (Bone loss) (таблица 30). Анализът на получените данни установява сигнификантна (статистически значима) корелация между HI и PD, HI и CAL, HI и костната загуба (bone loss) в мм. Подобни са резултатите, които получихме и по отношение на статистическа значимост на корелациите между PD и CAL, PD и Bone loss, и също така между CAL и костната загуба (таблица 31).

Оценка на установените зависимости между параметрите на пародонтита

(Корелационен анализ)

На таблица 31 са показани статистически достоверните корелации между основните параметри на пародонтита при настоящето изследване: възраст, хигиенен индекс, кървене при сондиране, дълбочина на джоба при сондиране, костна загуба.

Таблица 31. Корелационна матрица (Рангов корелационен анализ (Spearman)).

	HI%	BoP	PD	Cal	BoneLoss
Възраст	0,169	0,0213	0,111	0,148	-0,0257
	0,368	0,91	0,556	0,433	0,892
	30	30	30	30	30
HI%		-0,262*	-0,467*	-0,432*	-0,505*
		0,16	0,00953	0,0174	0,00464
		30	30	30	30
BoP			0,208	0,124	0,197
			0,268	0,512	0,294
			30	30	30
PD				0,815*	0,807*
				0	0
				30	30
Cal					0,778*
					0
					30

! Значимите корелации са отбелязани с *

От таблицата се вижда, че съществува силна положителна връзка между дълбочината на джоба от една страна и от друга страна - загубата на аташман (0,815) и костната загуба (0,807). Направеният анализ демонстрира и силна положителна корелация между загубата на аташман и костната загуба (0,778). Установени бяха умерени по сила отрицателни корелации между хигиенния индекс от една страна и от друга дълбочината на джоба (-0,467), загубата на аташман (-0,432) и костната загуба (-0,5). Това означава, че при по-високи стойности на хигиенния индекс (т.е. повече свободни от плака повърхности) другите показатели имат по-ниски стойности. Освен това беше установена и по-слаба отрицателна връзка между хигиенния индекс и кървенето при сондиране (-0,262).

Оценка на резултатите от определяне на генен полиморфизъм на IL-6, LT-A и TNF-A

Получените при настоящото изследване резултати показват голямо разнообразие в генотипното разпределение при изследваните групи. (Таблица 32 и Фигури 1-4 от Приложение б).

Таблица 32. Разпределение на генотиповете за IL-6, LT-A и TNF-A при отделните групи пациенти в проведеното изследване.

	Контролна група (здрав пародонт)		Пациент и с умерен хроничен пародонтит		Пациенти с тежък хроничен пародонтит		P - коефициент
	n	%	n	%	n	%	
Генотипове IL-6 (G-174C)	10		12		18		
CC	2	20.0%			1	5.6%	
GC	8	80.0%	8	66.7%	8	44.4%	
GG			4	33.3%	9	50.0%	0.05
IL-6 (G-597A)							
AA	2	20.0%			1	5.6%	
GA	8	80.0%	8	66.7%	8	44.4%	
GG			4	33.3%	9	50.0%	0.05
LT-A (A252G)							
AA			7	58.3%	4	22.2%	
AG	10	100.0%	4	33.3%	12	66.7%	
GG			1	8.3%	2	11.1%	0.02
TNF-A (G-308A)							
AA					1	5.6%	
GA	7	70.0%	4	33.3%	5	27.8%	
GG	3	30.0%	8	66.7%	12	66.7%	0.20

- Процентите са сравнени чрез Chi-square тест!

Анализ на получените резултати

- **IL-6 (G-174C)** – при контролната група (индивиди със здрав пародонт) не се среща генотип GG. При пациентите с тежък пародонтит този генотип се среща най-често, което пряко може да се обвърже с тежестта на хроничния пародонтит.
- **IL-6 (G-597A)** – при контролната група не се среща генотип GG. При пациентите с тежък пародонтит този генотип се среща най-често, което пряко може да се обвърже с тежестта на хроничния пародонтит.
- **LT-A (A252G)** – При контролната група се наблюдава единствено генотип AG! Наличието на другите два генотипа е характерно за пациентите с хроничен пародонтит. Отново при пациентите с тежък пародонтит генотип GG се среща най-често!
- **TNF-A (G-308A)** – При контролната група най-често срещаният генотип е GA (в 70% от случаите).

При пациентите с пародонтит честотата на откриване на генотип GG значително се повишава. Единствено при тежкия пародонтит се наблюдава и пациент с генотип AA (5.56% от случаите).

Въз основа на представените резултати може да се направят **основни обобщени изводи** за връзката на откриваните генотипове и състоянието на пародонта:

- Най-голяма обвързаност се наблюдава между генотиповете на LT-A и тежестта на пародонтита (**P = 0.02**)!
- По-слаба зависимост между откриваните генотипове и състоянието на пародонта засяга генотиповете на IL-6.
- Връзката между IL-6 (G-174C) и IL-6 (G-597A) е изключително силна (**P<0.001**)!
- За разлика от генотиповете на LT-A и генотиповете на IL-6 при TNF-A няма статически достоверна зависимост ($P > 0.05$) относно присъствието на изследваните генотипове и състоянието на пародонта.

На фигура 1 от Приложение 7 са представени процентните съотношения на генотипове на изследваните генни полиморфизми при всички изследвани пациенти (n=40). В контролната група преобладава GC генотип на IL6G174C генен полиморфизъм; GA генотип на IL6G597A генен полиморфизъм; AG генотип на LTAA252G генен полиморфизъм; GG генотип на TNFAG308A генен полиморфизъм. В групата на пациентите с умерен пародонтит преобладава GC генотип на IL6G174C

генен полиморфизъм; GA генотип на IL6G597A генен полиморфизъм; AA генотип на LTAA252G генен полиморфизъм; GG генотип на TNFAG308A генен полиморфизъм. В групата на пациентите с тежък пародонтит преобладава GG генотип на IL6G174C генен полиморфизъм; GG генотип на IL6G597A генен полиморфизъм; AG генотип на LTAA252G генен полиморфизъм; GG генотип на TNFAG308A генен полиморфизъм (Приложение 7).

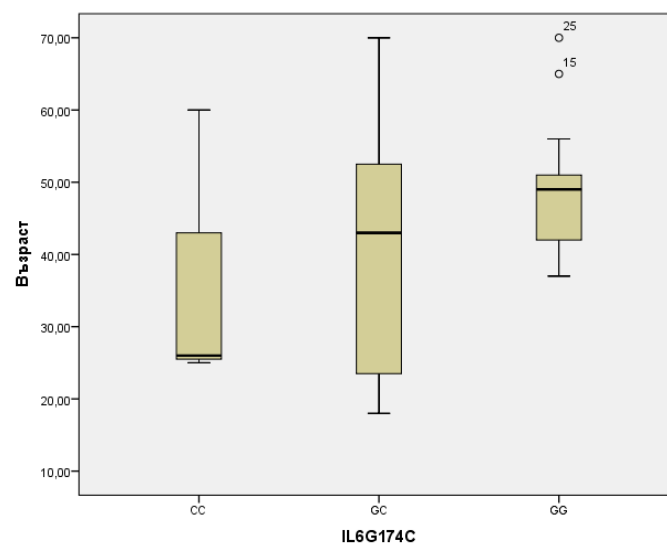
Статистическият анализ (* ANOVA и LSD PostHoc тест на резултатите от изследването на контролната и тест-група по отношение на генотиповете показва следните статистически достоверности в зависимост от:

* За праг на достоверност сме приели $p < 0,08!$)

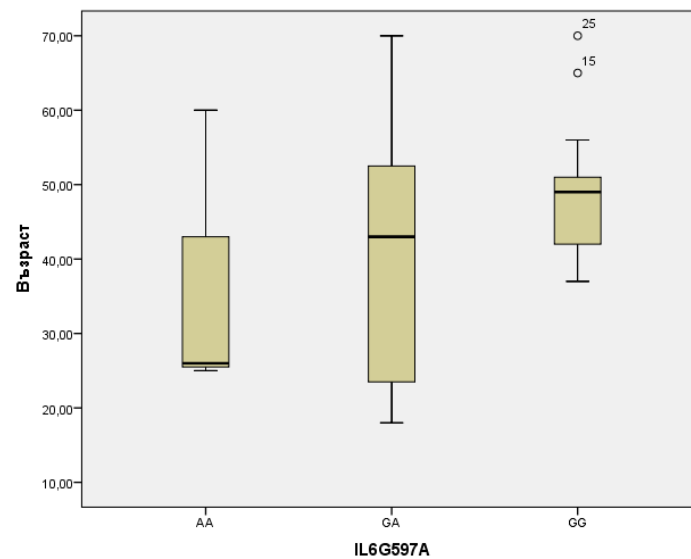
1) Възрастта

(а) **при всички изследвани хора** (пациенти с пародонтит и контроли със здрав пародонт) – в този случай присъстват и факторите пушене и пародонтит, които могат да са причина за част от наблюдаваните различия в откриваните генотипове и пародонталния статус!

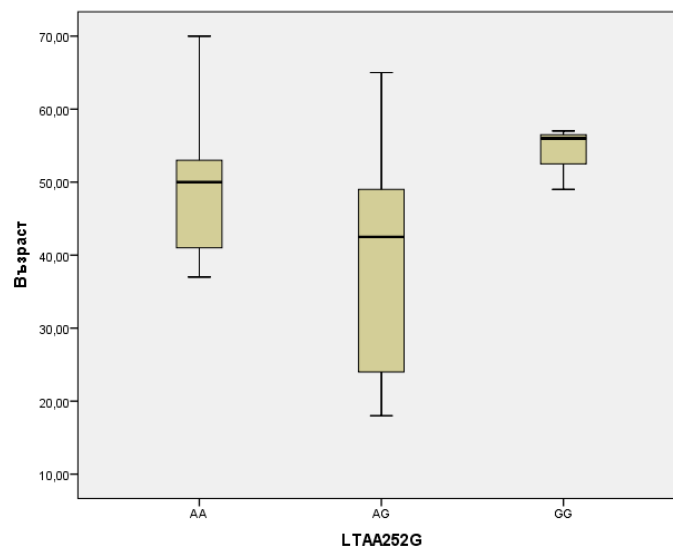
Фигура 37. IL-6 (G-174C) – **GG** (в сравнение с **GC**) се среща при по-възрастни пациенти! ($p = 0,082$) и те са с пародонтит!



Фигура 38. IL-6 (G-597A) – GG (в сравнение с GA) се среща при по-възрастни пациенти! ($p = 0,082$) и те са с пародонтит!



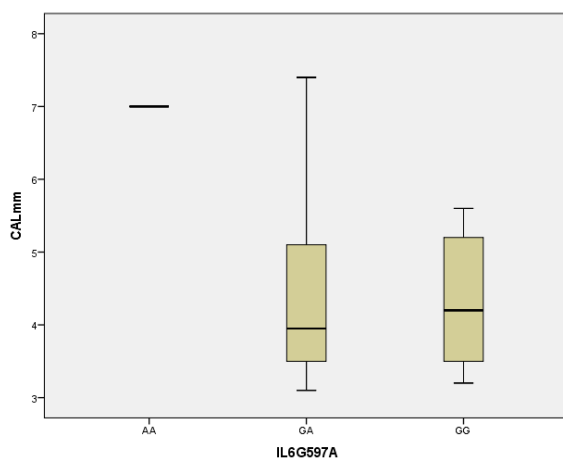
Фигура 39. LT-A (A252G) – AA и GG се срещат при по-възрастни пациенти, в сравнение с AG! ($p = 0,033$) и те са с пародонтит!



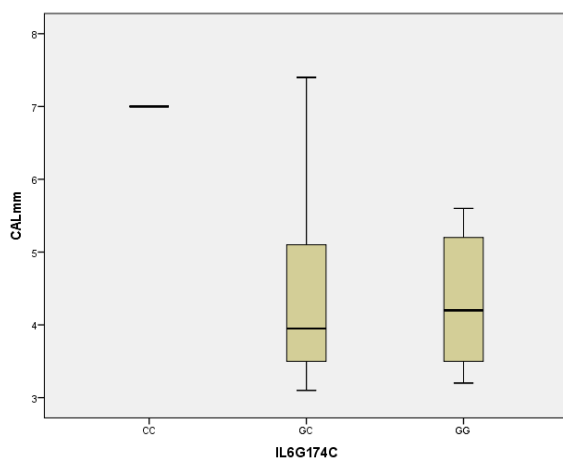
(б) само при пациенти с пародонтит – Не се установиха достоверни различия!

2) CAL mm

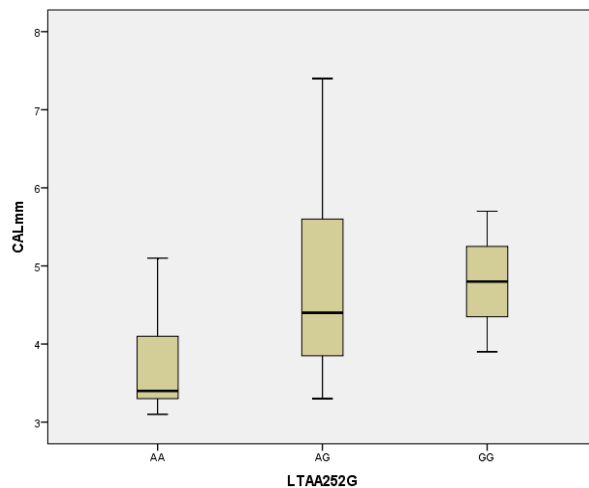
Фигура 40. IL-6 (G-174C) – По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG в сравнение с GC ($p = 0,067$).



Фигура 41. IL-6 (G-597A) – По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG в сравнение с GA ($p = 0,067$).



Фигура 42. LT-A (A252G) - По-високи стойности на CAL mm при присъствие на GG в сравнение с AG ($p = 0,018$).



Статистическият анализ ANOVA и PostHoc тест не показва достоверна връзка на отделните генотипове с параметрите HI% (оралната хигиена) и PDmm (дълбочината на джоба).

При настоящото проучване беше направено изследване за различия в зависимост от пола (сравнява се процентното разпределение) (Приложение 8).

Анализът на резултатите за генния полиморфизъм на изследваните цитокини показва:

- **IL-6 (G-174C)** – при жените се наблюдава по-висок процент на GC (63.33% спрямо 50% при мъжете) и значително по-нисък процент на CC (3.33% спрямо 20% при мъжете)
- **IL-6 (G-597A)** – при жените се наблюдава по-висок процент на GA (63.33% спрямо 50% при мъжете) и значително по-нисък процент на AA (3.33% спрямо 20% при мъжете)
- **LT-A (A252G)** – само при жените се наблюдава генотип GG (10% от случаите)
- **TNF-A (G-308A)** – само при жените се наблюдава генотип AA (3.33% от случаите)

Различия в разпределението на генотиповете във връзка с HI% (сравнява се процентното разпределение) (Приложение 9).

На фигурата в приложението е показана разликата в разпределението на генотиповете на изследваните генни полиморфизми, където се вижда, че присъствието на алел G е свързано с минималните стойности на HI(0%) при: IL6G174C генен полиморфизъм; IL6G597A генен полиморфизъм и LTAA252G генен полиморфизъм; докато за TNFAG308A генен полиморфизъм такава тенденция не беше установена.

Предиктивна стойност на изследваните показатели

За да проверим прогностичната стойност на изследваните показатели проведохме селекция чрез регресионен анализ - Backward Elimination.

Анализът на получените данни показва, че основният показател (генотип), чрез който може да се предскаже **тежестта на хроничния пародонтит е LT-A (A252G)** (таблица 33)! (**p=0.02**)

При разработения на базата на логистична регресия предиктивен модел е с обща точност 70%.

Таблица 33. Класификационна таблица за тежест на пародонтита.

Наблюдавани случаи	Предсказани случаи		Процент правилно предсказани
	Умерен пародонтит	Тежък пародонтит	
Умерен пародонтит	7	5	58.3%
Тежък пародонтит	4	14	77.8%
Обща точност			70%

Комбинирането на горния показател с генотиповете на другите три показателя (IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A) и TNF-A (G-308A)) не повиши общата точност на модела!

Обобщение от модела:

Тежките пародонтити са най-често свързани с присъствието на генотип на LT-A (A252G) AG, докато по-леките са свързани с присъствието на AA!

Резултати по задача 5. Да се получат данни за влиянието на рисковия фактор тютюнопушене при хроничен пародонтит.

Анализ на пациентите в проучването съобразно рисков фактор тютюнопушене

Таблица 34. Средни стойности на основни параметри на пародонтита според фактора тютюнопушене.

Клинични данни със средни стойности	Средно аритметична	Стандартно отклонение	Брой случаи
Възраст - пушачи	47.09	7.25	34
PVI средно-пушачи	2.19	0.68	34
PDmmAv-пушачи	3.99	0.75	34
CAL-пушачи	4.62	1.05	34
BoneLoss-пушачи	3.29	1.28	34
Възраст - непушачи	51.72	8.59	36
PVI средно-непушачи	2.19	0.61	36
PDmmAv-непушачи	3.65	0.76	36
CAL-непушачи	4.33	1.19	36
BoneLoss-непушачи	2.85	1.36	36

Данните от таблицата показват разлики при някои от изследваните параметри между пушачи и непушачи – по-високи стойности на дълбочина на пародонталните

джобове при сондиране, загубата на аташман, костната загуба при пушачите в сравнение с непушачите.

Таблица 35. Зависимост на оралната хигиена и кървенето при сондиране от тютюнопушенето.

Клинични данни в проценти	Средно аритметична	Ст. грешка	Брой случаи
HI%- пушачи	3.15	1.58	34
ВОР%- пушачи	95.68	14.68	34
HI%- непушачи	10.17	0.79	36
ВОР%- непушачи	95.86	8.55	36

Данните от таблицата показват, че пушачите имат по-малък процент свободни от плака повърхности и по-лош орално хигиенен стандарт. Не се установи статистически значима разлика при изследване на кървенето при сондиране на пародонталните джобове при пушачите в сравнение с непушачите.

В рамките на нашето изследване е направен анализ на връзката на тютюнопушенето като рисков фактор и тежестта на пародонтита като са използвани основни клинични параметри като дълбочината на джоба при сондиране и загубата на прикрепване.

Таблица 36. Влияние на тютюнопушенето върху дълбочина на джоба и загуба на аташман.

Показатели	Непушачи			Пушачи			p
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Дълбочина на сондиране – средна ст. (mm)	10	3,57	0,72	10	4,18	0,84	0,063
Загуба на аташман средна стойност (mm)	10	4,06	1,14	10	4,73	1,23	0,123

От получените резултати (таблица 36) може да се заключи, че:

- Тютюнопушенето оказва влияние с гранична сигнификантност ($p=0,063$) върху параметъра дълбочина на сондиране – средна ст. (mm);
- Присъствието на фактора пушене е свързано с по-високи стойности на основните изследвани параметри, свързани с тежестта на хроничния пародонтит – дълбочина на сондиране и загуба на аташман, но без да се установява статистическа значимост ($p=0,123$).

Таблица 37. Микроорганизми в пробите с различна дълбочина при пушачи и непущачи.

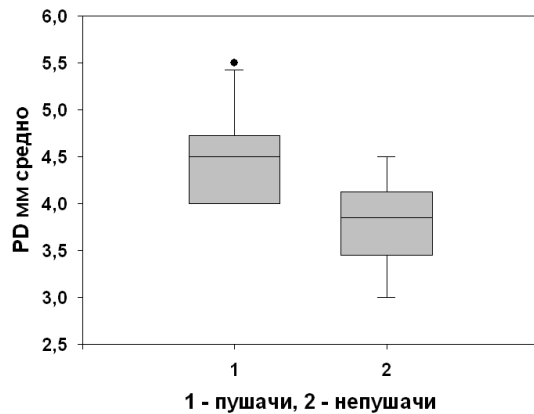
Общ брой микроорганизми при проби с дълбочина	Непушачи			Пушачи			p
	n	\bar{X}	SD	n	\bar{X}	SD	
Под < 4 mm	10	60160000,00	115544336,85	10	35980000,00	38686397,26	n.s.
4 – 6 mm	10	31700000,00	40575526,29	10	36240000,00	41462652,54	n.s.
Над > 6 mm	10	60250000,00	44863527,63	10	146730000,00	21348365,63	n.s.

Проучването върху връзката на пушенето с нивата на пародонтопатогените (общ брой) не установи статистически значима разлика в бактериалния товар в джобовете с различна дълбочина на пушачи и непущачи.

От получените резултати, представени на таблицата става ясно, че тютюнопушенето не оказва сигнификантно влияние върху общия брой микроорганизми в пробите с различна дълбочина.

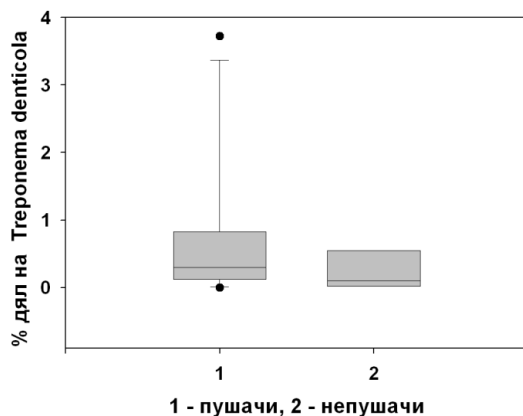
Достоверни разлики в зависимост от фактора тютюнопушене

Фигура 43. Графика на зависимостта между дълбочината на джоба (PD) и рисковия фактор тютюнопушене.

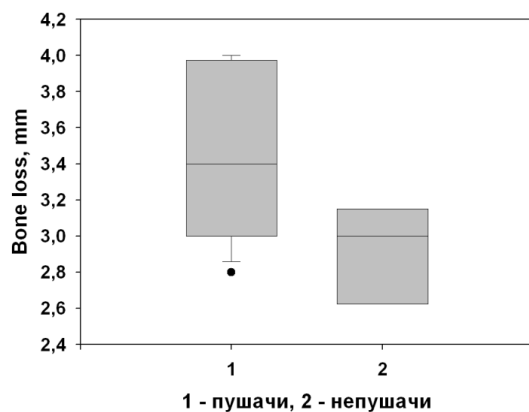


Достоверни различия се установяват относно „PD mm средна стойност” като при пушачите стойностите на дълбочината на джоба са значимо по-високи (фигура 43).

Фигура 44. Преваленция на *Treponema denticola* в дълбоките пародонтални джобове при рисковия фактор тютюнопушене.



Фигура 45. Зависимост между костната загуба (Bone loss) и рисковия фактор тютюнопушене.



Макар и с по-ниска степен на достоверност, може да приемем, че различия се наблюдават и по отношение на процентното присъствие на *Treponema denticola* (P = 0,9) в пародонталните джобове (**микробиологичен параметър**) и загубата на кост (Bone loss) (P=0,9) (фигура 44 и фигура 45). При пушачите се наблюдава по-висок процент от *Treponema denticola*, както и по-висока степен на костна загуба.

Таблица 38. Корелация между дълбочината на джоба и фактора тютюнопушене.

PD mm (средни стойности)	Показател	Корелационен коефициент (R)
	Тютюнопушене	0,648

От таблицата се вижда, че дълбочината на джоба корелира статистически достоверно с рисковия фактор тютюнопушене при изследваните пациенти с хроничен пародонтит.

Таблица 39. Сравнение на генните експресии в зависимост от фактора тютюнопушене при пациентите с хроничен пародонтит.

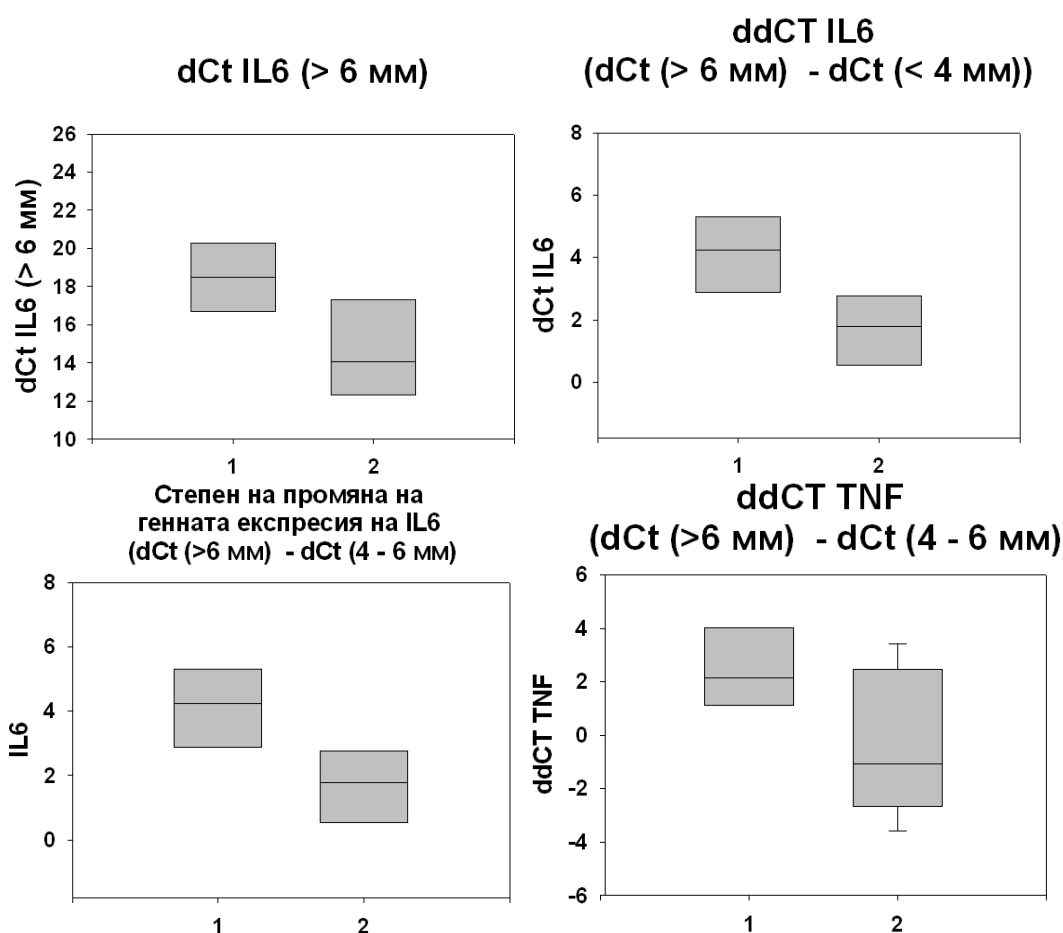
Показател	P – коефициент (t-test / Mann- Whitney U тест)	\bar{X} (пушачи)	\bar{X} (непушачи)
dCt IL6 (≤ 4 мм)	0.870	14.1	14.3
dCt TNF (≤ 4 мм)	0.885	6.9	6.5
dCt IL6 (4 – 6 мм)	0.753	16.0	16.6
dCt TNF (4 – 6 мм)	0.302	6.9	8.3
dCt IL6 (> 6 мм)	0.011*	18.5	14.3
dCt TNF (> 6 мм)	0.070	9.4	7.8
ddCT IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.563	1.15	3.0
Степен на промяна IL6 (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.421	0.2	0.1
ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.051*	4.2	1.7
Степен на промяна IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.226	0.1	0.2
ddCT IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.018*	3.4	-2.6
Степен на промяна IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.052*	0.2	3.2
ddCT TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.251	-0.5	0.9
Степен на промяна TNF (dCt (4 – 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.121	1.3	0.3
ddCT TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.867	2.1	1.2
Степен на промяна TNF (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм))	0.301	0.3	0.7
ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 – 6 мм))	0.049*	2.1	-1.1

Степен на промяна TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 - 6 мм))	0.152	0.2	0.5
--	-------	-----	-----

*p<0.06

Присъствието на фактора тютюнопушене се отразява статистически значимо върху генната експресия (dCt IL-6 (>6 мм)) и разликите в експресията на TNF (ddCT TNF (dCt (>6 мм) - dCt (4 - 6 мм))) и IL-6 ddCT IL6 (dCt (> 6 мм) - dCt (≤ 4 мм)) ddCT IL6 (dCt (>6 мм) - dCt (4 - 6 мм)) при p<0.06.

Фигури 46-49. Генна експресия на ген TNF и промени в зависимост от фактора тютюнопушене при пациенти - (1) пушачи (2) непушачи.



Представените на фигури 46-49 данни позволяват да се заключи, че тютюнопушенето като рисков фактор оказва значимо влияние върху изследваните генни експресии. Присъствието на този фактор се отразява върху експресията предимно в местата с по-голяма дълбочина на джоба (PD> 6 мм), както и върху

различията в експресията на IL6 и TNF между местата с голяма и умерена дълбочина (PD > 6 мм) и (PD 4-6 мм).

Данните потвърждават значим ефект на пушенето като рисков фактор върху тежестта на пародонтита.

Оценка на връзка между генния полиморфизъм и тютюнопушенето (сравнява се процентното разпределение): при всички изследвани хора (пациенти и контроли) - в този случай се наслагва влиянието на факторите възраст и пародонтит, във връзка с които могат да са налице част от наблюдаваните различия!

Основни резултати за разпределението на генотиповете в групите :

- **IL-6 (G-174C)** – само при непушачите се среща генотип CC (11.54% от случаите)

- **IL-6 (G-597A)** – само при непушачите се среща генотип AA (11.54% от случаите)

- **LT-A (A252G)** – само при непушачите се среща генотип GG (11.54% от случаите).

При непушачите се наблюдава и значително по-малък процент случаи с AG!

- **TNF-A (G-308A)** – само при непушачите се среща генотип AA (3.85% от случаите).

При непушачите се наблюдава и значително по-малък процент случаи с GG!

На фигура 1 от Приложение 10 са представени процентните разпределения на срещаните генотипове в зависимост от фактора пушене при изследваните пациенти. Легендата към всяка графика показва изследвания генен полиморфизъм и установените при изследването генотипове. От фигурата се вижда, че в групата на непушачите преобладава GC генотип на IL6G174C генен полиморфизъм; GA генотип на IL6G597A генен полиморфизъм; AG генотип на LTAA252G генен полиморфизъм; GA генотип на TNFAG308A генен полиморфизъм. В групата на пациентите - пушачи генотип GC и генотип GG на IL6G174C генен полиморфизъм се срещат по 50%; същото се отнася и до GA генотип и GG генотип на IL6G597A генен полиморфизъм; преобладава AG генотип на LTAA252G генен полиморфизъм и GG генотип на TNFAG308A генен полиморфизъм.

Резултати по задача 6. Създаване на алгоритъм за диференциран подход в инициалната диагноза на тежкия хроничен пародонтит на базата на бактериалната находка и компоненти на отговора на организма.

Анализирайки получените резултати в настоящото изследване и съобразявайки се със съвременните схващания за лечението на тежките пародонтити, предлагаме следната схема за алгоритъм:

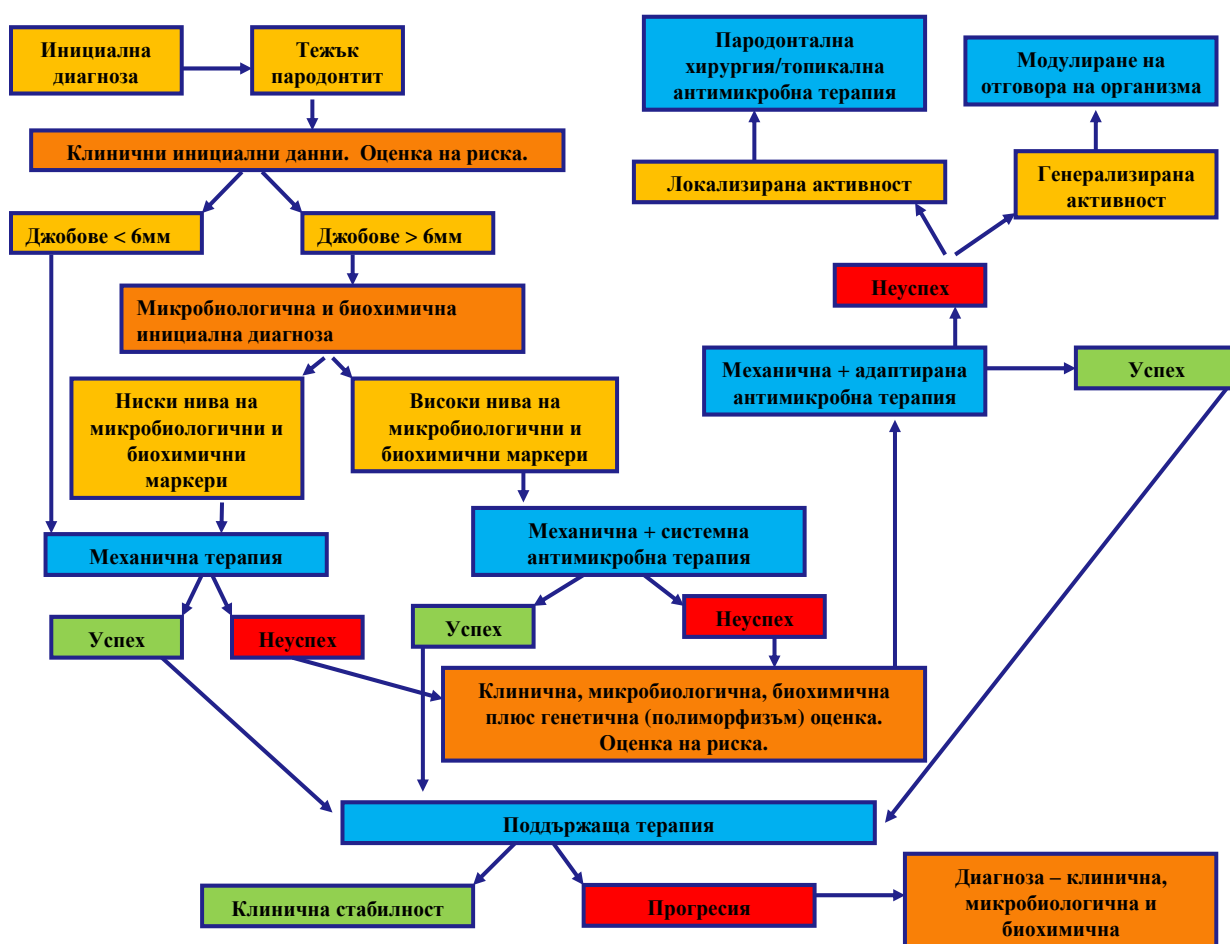


Схема 2. Алгоритъм на подход при лечението на тежък хроничен пародонтит.

При микробиологични и биохимични показатели за стабилност терапията се оценява като успешна и лечението може да продължи с поддържаща фаза. Намалената експресия на свързаните с имунния отговор и възпалението цитокини може да означава, че пародонталната терапия води до намаляване интензитета на микробното дразнене, което от своя страна води и до намалена стимулация на възпалението и имунния отговор.

Редуцираната експресия на интерлевкини може да се дължи на по-добрата регулация на отговора на организма в резултат на редуцираните нива на вирулентните микроорганизми. Данни от генетичните изследвания могат да потвърдят или отхвърлят генетична предиспозиция за продукция на възпалителни фактори и така да помогнат в планиране на следваща терапия.

На базата на данни за неуспех в разрешаването на присъствието на дълбоки пародонтални места (джоб>6мм или джобове>6мм) и данни за високи нива на субгингивални пародонтопатогени, високи нива на инфламаторни фактори и генен полиморфизъм се препоръчват и допълнителни стратегии при лечението на тежкия хроничен пародонтит – таргетна антиинфекциозна терапия, пародонтална хирургия, модулиране отговора на организма.

ОБСЪЖДАНЕ

Обсъждане по задача 1. Да се проведе скрининг на пациенти за сформирани на подходящи за проучването групи с диагноза хроничен пародонтит.

Литературата и клиничната практика сочат хроничния пародонтит за най-често срещания пародонтит, чиято преваленция и тежест се увеличават с възрастта. Заболяването може да засегне различен брой зъби, да прогресира неравномерно и в напредналите стадии води до загуба на зъбите. Диагнозата хроничен пародонтит сега основно се поставя на базата на клиничното изследване за присъствие на гингивално възпаление, пародонтални джобове и загуба на аташман, и се потвърждава от рентгенографските доказателства за костна загуба.

Клинично хроничните пародонтити се характеризират с гингивално възпаление - промени в цвета (зачервяване), контура (оточност) и консистенцията на гингивата, но също и кървене при сондиране в пародонталния джоб, загуба на прикрепване. Може да присъстват също и гингивална хиперплазия и/или ретракция на гингивата.

Диагнозата при пациентите с пародонтит цели не само установяването на тъканната деструкция, но и нейния обхват и тежест – броя на засегнатите пародонтални места и обема на загубен аташман и алвеоларна кост. **Измерванията** с пародонтална сонда се извършват във всички области на съзъбието и за всички зъбни повърхности – вестибуларна, орална, медиална, дистална, съобразно съвременната парадигма за място-специфичната деструкция на пародонта при пародонтит.

На базата на клиничните характеристики на пародонтита са създадени индексни системи за оценка на гингивалния и пародонтален статус. Детайлното определяне на степента на развитие на възпалителната гингивална лезия е обект на хистологично изследване. В клиничната практика приетият критерий за оценка на наличие на възпаление, както и за определяне на неговата тежест, е симптомата „кървене при сондиране”. Присъствието на кървене от дъното на джоба се смята за сигурен знак за присъствието на възпаление с всички познати хистологични характеристики. **Диагнозата на базата на кървене** в пародонталния джоб след лечение може да е индикатор за ефективността на приложената терапия, ориентир за рефрактерност или рецидив.

От съществена важност в диагнозата на пародонтита с цел планиране на адекватна терапия е определяне тежестта на заболяването. В съвременната литература са приети основни критерии за тежестта на пародонтита, които се определят чрез клинични и рентгенографски изследвания – загуба на аташман и загуба на кост.

Във връзка с това съществуват различни схеми за определяне на **тежестта на пародонтита**. В недалечното минало беше позната системата, при която лекия пародонтит се характеризира с костна загуба в коронарната 1/3 на корена; умерения – в средната трета и тежкия – в апикалната 1/3 на корена на зъба, която не е загубила своята валидност.

От 1999г. е приета съвременната класификация на пародонталните заболявания на „AAP” (American Academy of Periodontology), която определя тежестта на хроничния пародонтит на базата на загубата на клиничен аташман (CAL) по следния начин:

- Лек - 1–2 мм средна загуба на аташман (CAL);
- Умерен - 3 - 4 мм средна загуба на аташман (CAL);
- Тежък - 5 мм средна загуба на аташман (CAL).

Диагнозата на тежестта на хроничния пародонтит съобразява и други показатели като: костната загуба, дълбочината на пародонталните джобове при сондиране, засягането на фуркациите, подвижността на зъбите. Кървенето при сондиране е сензитивен метод за активност на гингивалното възпаление, но не се смята за толкова добър предиктор на прогресията на заболяването колкото например супурацията. Но от друга страна – липсата на кървене при сондиране се приема като индикатор за стабилизиране на пародонтита. Прецизната диагноза на тежестта на пародонтита изисква включването на всички критерии.

В хода на пародонталното заболяване загубата на аташман обикновено е свързана с присъствието на пародонтални джобове. **Дълбочината на пародонталния джоб** в инициалната диагноза е основен критерий за определяне на прогнозата и избора на лечебен подход. Днес се отдава значение и на специфичната архитектура на пародонталния джоб, морфологията на костните дефекти, както и на присъстващата бактериална флора. Така например пародонталният джоб може да се разгледа като пространство, съставено от: една апикална част (епителното и съединителнотъканно прикрепване), една мека стена (епитела на джоба повече или по-малко улцерирани), една твърда стена (корена на зъба с контаминиран цемент, биофилм и зъбен камък), и

отворен към оралната среда. Дълбочината на джоба при сондиране се измерва с дистанцията между гингивалния ръб и позицията на върха на градуирана пародонтална сонда (която трябва да е в дъното на джоба). Пародонталният джоб е изпълнен с гингивална течност, адхерирани и не-адхерирани бактерии, вируси, паразити, гъбички, поломорфонуклеарни неутрофили и епителни клетки и е обект на микробиологична и биохимична диагноза.

Сложната характеристика на пародонталния джоб и факторите, свързани с локалното определяне на актуалната пародонтална загуба, както и прогнозата на всяко място и общо на заболяването, както и предикцията на прогресията, изисква получаване на информация, по-широка в сравнение само с регистрацията на вече настъпилата загуба. Съобразяването само на дълбочината на джоба, която освен това често е резултат на свръхизмерване, тъй като при възпаление пародонталната сонда пенетрира през свързващия епител, супракресталните фибри и дори пародонталния лигамент, е недостатъчно за пълно интерпретиране на пародонталния статус на пациента (32). Трябва да подчертаем обаче съществената роля на дълбочината на джоба при сондиране при дефинирането на тежестта на пародонтита, особено когато нашият основен критерий – загубата на аташман не може да се определи. Това е често явление особено при напредналите пародонтити, където по различни причини позицията на емайло-циментовата граница не може да се установи с точност. При това логично е да разглеждаме умерено дълбоките и дълбоките пародонтални джобове като източник на инфекцията, която се поддържа, и да приемаме присъствието им за значимо за тежестта на хроничния пародонтит.

Идентифицирането на микробния състав на пародонталния джоб може да послужи за откриване на предразположените към инфекция места при пациентите с пародонтит. По този начин би могло да се направи оценка на риска от прогресия и да се използват резултатите от микробиологичния анализ за предикцията на рисковите места. Активно се търсят бактериални маркери в местата с персистираща прогресия на деструкцията и случаите на незадовоителен отговор към терапията.

Причините за прогресията и рецидива на пародонталната деструкция биха могли да бъдат както пропуски в пародонталната поддържаща терапия, така и повторното свръхрастване на вирулентни патогенни бактерии, които колонизират не само пародонталните джобове, но също и гърба на езика, оралната мукоза и тонзилите. В случаите на тежките пародонтити и пародонтитите с лош отговор към проведената терапия микробната идентификация цели да определи бактериалния рисков профил на

пародонтита и да подобри ефикасността на пародонталното лечение. Това би било полезно за ограничаване на неконтролируемото назначаване на широкоспектърни антибиотици в ежедневната практика. Лекарите по дентална медицина би трябвало да селектират пациентите за микробиологичните изследвания, а това са пациенти с тежък пародонтит, агресивен и рефрактерен, рецидив, място-специфична активност (когато прогресират загубата на аташман и дълбочината на джоба, при персистиращо кървене при сондиране и супурация). Показаната връзка между пародонталните патогени и активността на пародонталното заболяване служи за основа на решенията за прилагане на микробиологичните тестове в клиничната практика (126).

Загубата на аташман се определя чрез градуирана пародонтална сонда като дистанцията между цемента-емайловата граница и дъното на джоба (свързващия епител) в мм. Това е параметър с голяма значимост за определяне тежестта на пародонтита и/или стабилността на пародонталния статус след лечение или прогресията на заболяването.

В популацията варират формите на пародонтит, които показват и различия в степените на прогресия на заболяванията във времето. На съвременното ниво на познанието **регистрирането на прогресията** на пародонтита, особено на малка прогресия, е проблем за клинициста. Персистиращото кървене от джоба може да е свързано с локална прогресия. За сигурен критерий на прогресия на пародонтита се приема **допълнителната загуба на аташман** – локализирана или генерализирана, с който критерий всъщност се осъществява късна диагноза като се имат предвид и несъвършенствата на сондирането с ръчни пародонтални сонди. Загуба на аташман минимум 2мм за една година се приема за индикатор за прогресия на заболяването.

Изследванията на нелекувани индивиди за по-дълги интервали от време показват прогресиране на пародонтита, изразено като **0.05-0.3мм** загуба на аташман/година (прогресивен модел). Когато популацията се изследва в по-къси интервали от време индивидуалните места демонстрират и къси фази за загуба на прикрепване, редуващи се с периоди без активност на заболяването (с прекъсване и ремисии). От съвременна гледна точка и двата типа прогресия може да се разглеждат като манифестация на един и същи феномен – някои места бележат подобрение, докато други – прогресират, по т. нар. цикличен модел. Пациентите с хроничен пародонтит обикновено показват слаба прогресия на загубата на аташман и костната загуба. В някои случаи обаче се установява по-бърза загуба, която може да е свързана с присъствие на локални фактори – неблагоприятна анатомия на зъбите, позиция, които стават също фактор за

прогресията. Други фактори – тютюнопушене, диабет, генетичен профил с увеличена продукция на инфламаторни цитокини, също играят основна роля за по-бързите деструктивни процеси в пародонта. Идентифицирането на някои от тези фактори е необходимо в диагнозата на предикцията и контрола на прогресията на хроничния пародонтит.

При напредване на пародонтита в областта на многокореновите зъби, деструктивният процес може да обхване и областта на фуркацията. Точното определяне на присъствието и размера на загубата на пародонтална поддръжка във фуркационната област има значимо отношение към прецизната диагноза и коректния лечебен план, както и определя в значителна степен прогнозата на заболяването.

Прогнозата се дефинира като предвиждане на хода, продължителността и резултата от протичане на заболяването на базата на познанията за етиологията и патогенезата на пародонталните заболявания и присъствието на индивидуални рискови фактори.

Известни са факторите при определяне на прогнозата на пародонтита: загуба на аташман, костна загуба, дълбочина на пародонталните джобове, тип на костната загуба и др. От тях дълбочината на пародонталните джобове се приема с по-ниска стойност като значимост в сравнение с определянето на загубата на аташман тъй като сама по себе си дълбочината може да е свързана само с промени в меките тъкани. В литературата е прието становището, че зъбите с по-дълбоки джобове, но с малка загуба на аташман и малка костна загуба имат по-добра прогноза в сравнение със зъби с плитки джобове и голяма загуба на кост и аташман. Въпреки това се обсъжда и мнението, че по-дълбоките джобове могат да са източник за ре-инфекция и да са свързани с прогресиране на заболяването.

Характеристиката на морфологията на костната загуба е необходима в инициалната диагноза на пародонтита. Хоризонталната костна загуба не е задължително свързана с добрата прогноза на заболяването. Така например ангуларните костни дефекти с по-голям брой запазени костни стени и благоприятен костен контур биха могли да реагират добре на регенеративната пародонтална терапия и така да се спечели пародонтална поддръжка, а при супраосалните костни джобове регенеративна терапия не е индицирана и подобряването на височината на интерденталната кост не е постижимо.

Възрастта има също значение при определяне на прогнозата на заболяването. При пациентите в по-млада възраст прогнозата е по-лоша в сравнение с по-възрастните заради по-краткия интервал на изязвата и прогресията на пародонтита.

Трябва да подчертаем, че използваните в настоящото проучване материали, клинични критерии и методи са съобразени със съвременното становище в диагнозата на хроничния пародонтит. През 2015г. ААР публикува осъвременената си концепция за класификацията на пародонталните заболявания на базата на класификацията от 1999г. Тя потвърждава схващането за хроничния пародонтит като инфекциозно заболяване, характеризиращо се с различен обхват и тежест, с възпаление в поддържащите зъбите тъкани, кървене при сондиране, >3мм дълбочина на пародонталния джоб при установени загуба на аташман и рентгенографска костна загуба (14).

Обсъждане по задача 2.

Обсъждане по под-задача 2.1. Основни пародонтопатогени при пародонтални джобове с различна дълбочина (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) във връзка с тежестта на пародонтита.

Голямото разпространение и социалната значимост на хроничния пародонтит поставят това пародонтално заболяване в центъра на интересите на проучванията в последните няколко десетилетия. С особена значимост са изследванията, свързани с изясняване на присъствието и нивата на пародонтопатогените в пародонталната среда, резултатите от които да добавят информация за инфекциозната етиология на хроничния пародонтит, да подобрят диагнозата на тежките и прогресиращи случаи на хроничен пародонтит и да предоставят критерии за успешна пародонтална терапия. Има литературни данни за високи нива на познати пародонтопатогени в дълбоките пародонтални джобове, които се свързват с напредналата загуба на аташман и кост, както и се оценяват като източник на инфекция за останалите пародонтални места (33,157,174,177,182).

Получените данни от изследваните пациенти показват, че при пациентите с тежък хроничен пародонтит средната измерена дълбочина на джоба при сондиране е **4,2мм**, а на представената хистограма (фигура 4 в приложение 4) се вижда, че преобладаващата част от пациентите имат средна дълбочина на сондиране, близка повече до **5мм**.

Проведеният регресионен анализ установи наличие на зависимост ($p < 0.001$, $R^2 = 0.729$) между костната загуба и пародонтални места с дълбочина на сондиране > 6 mm. Зависимостта има право-пропорционален характер, като увеличението на PD_GT_6mm с 1% води до среднестатистическо увеличение на Bone loss с около 0,12 mm (фигура 6, стр.62).

Клиничните характеристики на пародонтита като загуба на аташман, дълбочина на джоба при сондиране и кървене при сондиране, имат известни ограничения при оценката на прогнозата на заболяването. Въпреки това литературни данни показват, че дълбоките места представляват по-голям риск за прогресия в сравнение с плитките места, както при лекувани, така и при нелекувани пациенти (60). Клинични изследвания все пак демонстрират, че измерената дълбочина на джоба при сондиране не може категорично да се използва за истински точен предиктор на бъдеща прогресия на пародонтита (60). Ето защо се търсят допълнителни маркери за предикция на прогресията на пародонтита като присъствието и нивата на пародонтални патогени, както и нивата на генната експресия на цитокините.

Сравняването на дълбоките и плитките места показва, че дълбоките пародонтални джобове се характеризират с по-голямо разпространение на кървенето при сондиране, увеличени нива на пародонтални патогени, по-слаба ефективност на орално-хигиенните процедури и на професионалното инструментирание, насочени към отстраняване на субгингивалния биофилм и обработката на кореновите повърхности (60,63,68,138,155,156,183).

В настоящото изследване единият от фокусите е връзката на дълбочината на джоба при сондиране с присъствието на патогенни бактериалните видове. Получените резултати за количественото представяне на изследваните пародонтални патогени: *T. denticola* и *P. gingivalis*, е в съгласие с данните от литературата, които показват увеличаване нивата на патогенните микроорганизми при пародонтит паралелно с увеличаването на дълбочината на джоба (61a,64,137,157,181).

При проведеното от нас проучване установихме *P. gingivalis* (фигура 50) и *T. denticola* (фигура 51) в по-големи количества в по-дълбоките пародонтални джобове на пациенти с хроничен пародонтит. Изследваните микроорганизми се откриват и в плитките пародонтални джобове (до 4мм) при пациентите с хроничен пародонтит, но в значително по-малки количества. Установена е ясна тенденция на повишаване на нивата при джобовете с дълбочина 4-6мм, която продължава при джобовете над 6мм, като същото се наблюдава и по отношение на общия брой пародонтопатогени / проба

(таблица 40). Като цяло в нашето проучване *T. denticola* и *P. gingivalis* бяха установени в голям процент от взетите субгингивалните проби от джобове с различна дълбочина (*P. gingivalis* - в 95,8%; *T. denticola* - в 98,2%).

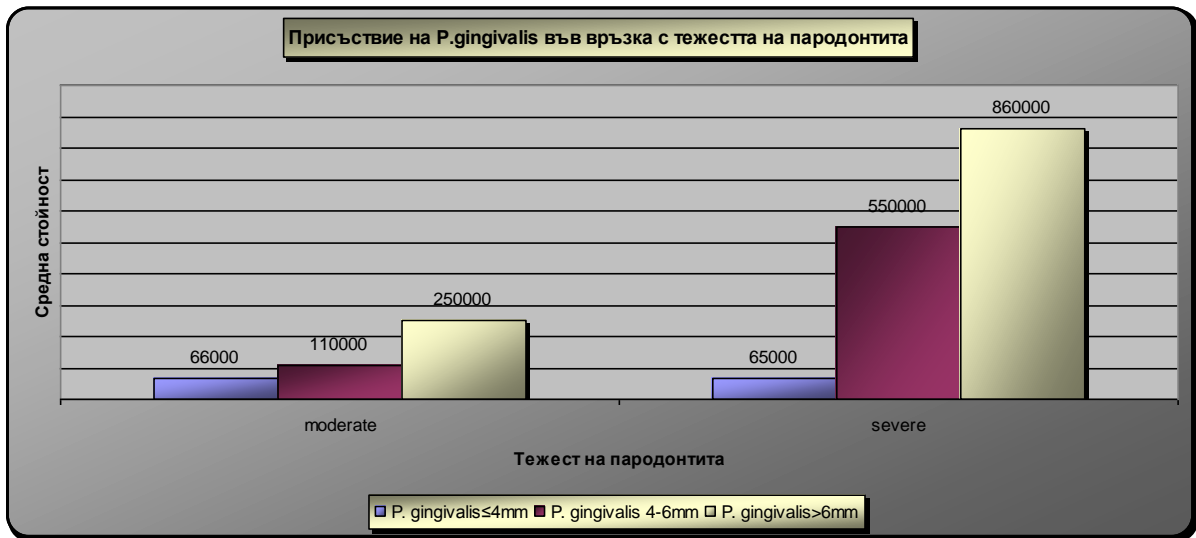
Таблица 40. Нива на пародонталните патогени в пародонтални джобове с различна дълбочина.

Пародонтални джобове	МО	<i>P. gingivalis</i>	<i>T. denticola</i>
плитки		$7,4 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$
средно дълбоки		$3,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
дълбоки		$5,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$

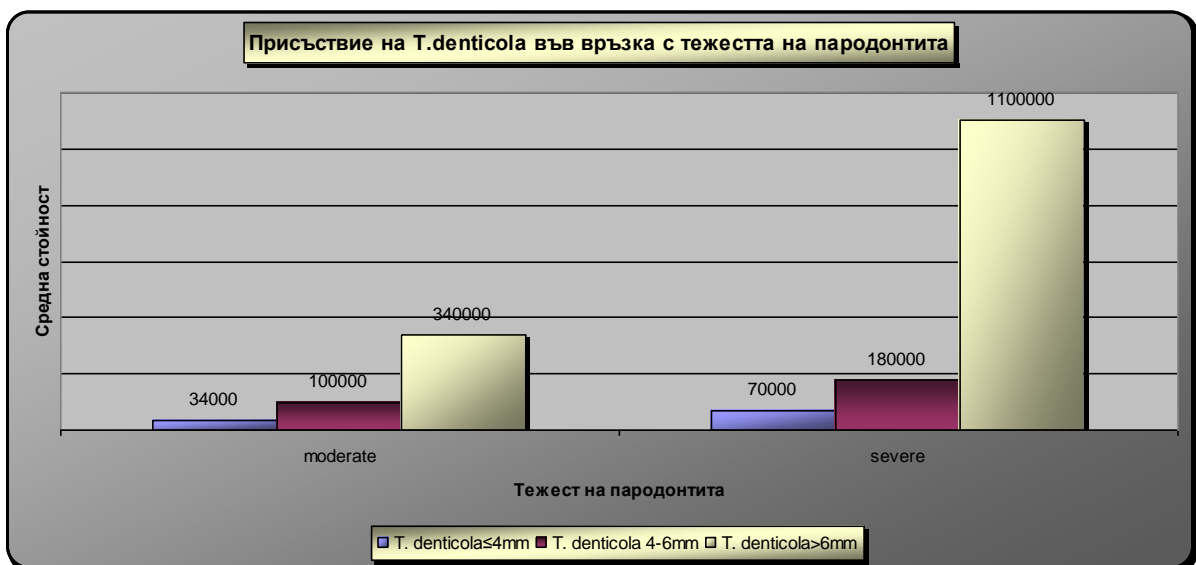
Тези патогени са тясно свързани с умерените и дълбоки пародонтални места, но те също така присъстват в по-ниски нива и в плитките пародонтални джобове. Вероятно тези патогени могат да съществуват в малки количества дори в плитките пародонтални места, да пролиферират в резултат на възпалителния процес, и да се размножават в благоприятна за тях среда с достатъчно налични хранителни вещества и на фона на нарушения интегритет на епителните клетки. Знае се, че в дълбоките пародонтални джобове тези условия са по-благоприятни за бактериите. Това може до известна степен да обясни по-високи нива на откритите пародонтопатогени в по-дълбоките пародонтални джобове.

Данните са в съгласие с твърденията на други автори, че тези два патогенни микроорганизма, откривани във високи нива в дълбоки джобове, имат съществена роля в инициирането и/или разгръщането на патогенезата при пародонталните заболявания. Едно логично обяснение за присъствието им в плитките пародонтални места е вероятното инфектиране на тези места от пародонтопатогените от налични по-дълбоки места, както и от други известни потенциални резервоари (като напр. тонзилите или гърба на езика) (64,137,157,181).

Фигура 50. Резултати за присъствието на *P.gingivalis* в плитки, средно дълбоки и дълбоки пародонтални джобове при пациенти с умерен и тежък пародонтит.



Фигура 51. Резултати за присъствието на *T.denticola* в плитки, средно дълбоки и дълбоки пародонтални джобове при пациенти с умерен и тежък пародонтит.



Получените резултати (фигури 50 и 51) категорично показват връзката между микробната находка и дълбочината на пародонталните джобове като критерий за тежестта на пародонтита. Количеството на изследваните микроорганизми прогресивно нараства с измерването на по-голяма дълбочина на сондиране както при пациентите с умерен пародонтит, така и при пациентите с тежък пародонтит. Данните ясно демонстрират висшко степен на положителни корелации между присъствието на *P. gingivalis* и *T. denticola* и тежестта на хроничния пародонтит. Те внушават значима роля

на изследваните микроорганизми в иницирането и прогресията на пародонталната лезия.

Има данни, че широк спектър от предимно Грам-негативни бактерии и спирохети като: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, са позитивно асоциирани с тежестта и прогресията на пародонтита (23). Едновременно присъствие на *P.gingivalis*, *T.forsythia* и *T.denticola* се открива по-често в субгингивалната плака от места с пародонтална заболяване (голяма дълбочина на джоба, присъствие на кървене при сондиране) в сравнение със здрави места. Находката може да рефлектира в протокол на клинично поведение за прецизна диагноза при хроничен пародонтит. Основните клинични ситуации, когато се препоръчват бактериологичните изследвания са при тежки пародонтити, недобър резултат от инициалната терапия, рецидиви, пародонтити, асоциирани с общи патологии (34).

Присъствието на някои патогени позволява да се прецени еволюцията на пародонталните лезии (*P. gingivalis*). Едновременното присъствие на дадени бактериални видове (*A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *Pr.intermedia*, *T. forsythia*, *T.denticola*) може да потенцира тяхната вирулентност и да ускори процеса на деструкция на пародонталните тъкани. Присъствието на *P.gingivalis*, *T. forsythia* и *T.denticola* едновременно показва симбиотична колонизация с трите таргетни вида и се приема като индикатор за риск от прогресия на пародонтита (23,34,61a,171a).

Получените данни при изпълнението на под-задача 2.1. ясно показват значимостта на клиничните показатели за тежестта на пародонтите, както и на детекцията на пародонталните патогени *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* и на общия брой микроорганизми в развитието на пародонтита. Те също така потвърждават категорично събраните литературни данни за здрави синергични взаимовръзки между микроорганизмите от червения комплекс на Socransky. Едновременното им присъствие в пробите от пародонталните джобове се обсъжда и като рисков фактор за очакван лош отговор към бъдещото нехирургично лечение (117,157,175,182).

На фигура 52 и фигура 53 е представено разпространението на пародонталните патогени в зависимост от дълбочината на пародонталните джобове от допълнително изследване (“Subgingival periodontal microbiota in deep periodontal pockets in cases with severe periodontitis”, *Chr. Popova, V. Dosseva, K. Kotsilkov*, постер, ИМАВ, 2009г.), което не е включено в дисертационния труд, но резултатите от него са показателни и биха

били интерес във връзка с изпълнението на под-задачата. В изследването са включени 10 пациента с диагноза тежък хроничен пародонтит. На базата на измерената дълбочина на джоба при сондиране пародонталните местата се категоризират в две групи: I гр. - до 6мм; II гр. – над 6мм. За вземане на проба се избираше най- дълбокия джоб от всеки квадрант - общо 4 проби на пациент - по една за всеки квадрант. Идентификацията и количеството на пародонталните патогени: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* и на представителите на червения комплекс: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* се определиха чрез IAI PadoTest4•5.

Фигура 52. Представена е детекцията на *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* в пародонтални джобове с различна дълбочина.



Фигура 53. Графиката демонстрира едновременната детекция на *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis* в пародонталните джобове с различна дълбочина на сондиране.



При това изследване се установи, че честотата на идентифициране на изследваните микроорганизми категорично корелира с увеличаването на дълбочината на джоба при сондиране (фигура 52). Освен това са получени категорични данни за едновременната детекция на *P.gingivalis* и *T. forsythia* при джобовете до и над 6мм (фигура 53).

Обсъждане по под-задача 2.2. Пълен пародонтопатогенен спектър при дълбоки пародонтални джобове (9 контролни щама: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis*) във връзка с тежестта на пародонтита.

Литературните данни свидетелстват за присъствието на определени Грам-отрицателни анаеробни микроорганизми в субгингивалното пространство при пациенти с хроничен пародонтит (23,23а,50,64,69,77). Обсъжда се широко ролята им във връзка с тежестта на пародонтита, както и участието им в процесите на прогресиращата деструкция на меките тъкани и костта (28,35,42).

При проведеното от нас изследване общият брой микроорганизми показва значима правопрпорционална зависимост единствено с *Tannerella forsythia* ($R=0,46$) и по-силна обратнопропорционална взаимовръзка с процентния дял на *Porphyromonas gingivalis* ($R=-0,71$) и *Peptostreptococcus micros* ($R=-0,60$). Т.е. При пациенти с малък общ брой микроорганизми се наблюдава малък брой на *Tannerella forsythia* и увеличен процентен дял на *Porphyromonas gingivalis* и *Peptostreptococcus micros*.

В настоящото проучване бяха установени значими взаимовръзки между количествата на изследваните видове бактерии при проведен рангов корелационен анализ (Spearman): положителни корелации между *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* от една страна и между *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis* от друга, а отрицателна корелация –между *Eubacterium nodatum* и *Fusobacterium nucleatum*.

Както е показано от Hamlet et al. 2001г. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* проявява различно поведение в сравнение с останалите патогени и е детектиран с пониска честота в дълбоките пародонтални джобове (69). Това би могло да бъде обяснено с факта, че този патогенен микроорганизъм е факултативен анаероб. При нашите изследвания не установихме присъствието на този микроорганизъм в субгинагивалните

проби при хроничен пародонтит. Това още веднъж потвърждава данните от литературата тъй като присъствието на Aa се свързва силно с агресивните пародонтити и по-специално локализирания ювенилен пародонтит и не е откриван често при хроничен пародонтит.

На базата на проведените при настоящето изследване клъстерен анализ може да се види, че са обособени 2 основни групи от микробни видове:

1 група: Tf – Pm – Td – Fn – Pg (Представители на червения и оранжевия комплекс)

2 група: Pi – Cg – En (Представители на оранжев, оранжево-асоцииран и зелен комплекс)

Получените при настоящето проучване резултати потвърждават данните за асоциациите на *P.gingivalis* с микроорганизми от червения и оранжевия комплекси на Sokransky и по-специално: *Tf*, *Fn*, *Td*. Тези микроорганизми взаимно усилват своите растеж, вирулентност и активност, резултиращи в тъканна деструкция. Има доказателства в литературата за положителните синергични отношения на изолираните и групирани по този начин при нашето проучване горепосочени микроорганизми, за които е установена силна връзка с патогенезата на пародонталните заболявания. При проведеното от нас изследване се установи позитивна връзка между *C.gingivalis* и *E.nodatum*. *C.gingivalis* попада в зеления комплекс на Sokransky, който се свързва със състоянието на пародонтално здраве, но макар и по-рядко, се съобщава да е бил изолиран и от места с развита пародонтална лезия.

Резултатите от настоящето изследване във връзка с изпълнението на задачата отново силно потвърждават данните от реферираната литература за присъствието на определени пародонтопатогени в субгингивалното пространство при хроничен пародонтит (23а,35,65,77,97,155,179).

Дълбоките пародонтални джобове се определят като по-благоприятна среда за развитие на анаеробните микроорганизми и следователно може да се очаква тези патогени да присъстват в по-големи количества в местата с по-голяма дълбочина на сондиране. При изследването си Farias et al. 2012г. съобщават, че в местата с дълбочина на джоба при сондиране >8мм е установена по-висока честота на откриване на комбинацията от *Tf* и *Pg*, и *Tf*, *Td* и *Pg* (50). Това още веднъж потвърждава строгата асоциация на хроничния пародонтит и бактериите от червения комплекс, показано от

Socransky et al. 1998г. и Hamlet et al. 2001г. (69,157). Известно е изследването на Socransky et al. 2000г. във връзка с нивата на пародонтални патогени при пациенти с пародонтит, асоциирани с полиморфизъм на интерлевкин-1 β . Средният бактериален товар е установено да се променя сигнификантно в зависимост от различните категории пародонтални джобове (>4мм; 4-6мм и >6мм) с най-високи стойности за всеки бактериален вид в най-дълбоките пародонтални джобове. Авторите отново категорично определят асоциацията на трите детектирани микроорганизма: *Pg*, *Tf* и *Td* и внушават участието им в патогенезата на пародонтита.

В изследването си Zambon също показва строга асоциация между *Pg* и *Tf* от една страна, и от друга – между тези микроорганизми и патогенезата на пародонтита като определя присъствието им за признак за загуба на пародонтални тъкани и тежка костна резорбция (183). Едновременното присъствие на тези микроорганизми в дълбоките пародонтални места внушава разгръщането на симбиотични взаимоотношения между вирулентните видове, което води до бъдеща прогресия на пародонталното заболяване (72,183).

Прилагането на микробиологичните тестове следва да е насочено към оформянето на по-верен лечебен план на базата на получената информация. Rapanou et al. внушават, че микробния състав на пародонталния джоб е детерминант от генната експресия в гингивалната тъкан и би могло да служи за идентификация на по-податливите или предразположени места на основата на персистиращата прогресия или незадоволителен отговор към лечението (126).

Основна причина за загуба на зъбите в нашето съвремие е пародонтитът. Превенцията на пародонтита е неделима част от общото и оралното здраве. Повечето пациенти имат добър отговор към конвенционалното пародонтално лечение и субгингивалното инструментiranje заедно с качествен персонален плаков контрол е най-адекватния избор в инициалната терапия на умерените и леките по тежест хронични пародонтити. При някои пациенти обаче сме свидетели на продължаваща активност на възпалението и лош отговор въпреки полжените усилия и от пациента, и от клинициста.

В заключение трябва да подчертаем, че микробиологичният анализ не бива да се приема като част от рутинното първоначално изследване на пациентите с пародонтит. Добре би било този тип анализ да се адаптира към по-специфичните клинични ситуации, в които да се потърси определен микробен профил във връзка с

клиничните и рентгенографски характеристики с цел таргетна и ефективна антимикробна терапия.

Обсъждане по под-задача 2.3. Субгингивално и орално присъствие на *Candida albicans* при хроничен пародонтит.

Изследванията върху микробния състав на субгингивалната плака показват присъствието на много бактериални видове, но относително малък брой патогенни микроорганизми са асоциирани силно с хроничния пародонтит (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и др.). Увеличените им нива са важен параметър при оценяването им като пародонтопатогени (65,64,67,82,127,154). Автори се опитват да свържат и присъствието на други бактериални видове при хроничния пародонти, за които няма категорични доказателства, че участват в инициирането и прогресията на заболяването (22,30,107,141,176). Откриването в субгингивалната плака при пациенти с пародонтит на такива видове с неизяснена роля и съвременната концепция за пародонтита като заболяване с полимикробна смесена инфекция биха могли да обяснят случаи на лош отговор към проведената конвенционална терапия в клиничната практика. Тъй като в литературата се обсъжда присъствието и значимостта на *Candida* инфекцията в оралната среда при пациенти с пародонтит, се насочихме към изследване на присъствието и нивата на *Candida spp.* в дълбоки пародонтални джобове и по оралната мукоза при пациенти с хроничен пародонтит.

В настоящото проучване не беше установено да съществува корелация на *Candida spp.* с клиничната експресия на пародонтита. Въпреки че резултатите не са статистически значими в случаите с хронични пародонтити при системно здравии лица, такива изследвания може би биха били полезни в случаите с различни системни заболявания и състояния, като се има предвид риска от *Candida* инфекция (136,142). Има данни в литературата за това, че увеличени нива на *Candida spp.* по оралната лигавица и в пародонталните джобове могат да се свържат със състояния на имunosупресия и нарушено микробно равновесие (напр. след хирургична интервенция, тежки вирусни и бактериални инфекции на оралната мукоза, след продължителна антибиотична терапия, при HIV инфекция, присъствие на пластмасови протезни

конструкции). В настоящото изследване пациентите с хроничен пародонтит са системно здрави и приемаме, че установената ниска честота на присъствие на *Candida spp.* е резултат, съответен на литературните данни (110). В същото време установената бактериална находна в това изследване потвърждава данните в литературата за здравата връзка на тежкия хроничен периодонтит с присъствието на високи нива на основните пародонтални патогени: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus /Micromonas/ micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum* (63,64,65,102,143,159,177). Настоящото проучване показва ясна корелация на нивата на тези микроорганизми за тежестта на пародонтита чрез основните клинични параметри - тежестта на гингивалното възпаление, дълбочината на пародонталните джобове, загубата на клиничен аташман и костната загуба.

Резултатите от това проучване са в подкрепа на необходимостта от допълнителни микробиологични тестове в случаи на тежки пародонтити с наличие на дълбоки пародонтални джобове и данни за пациента, които го свързват с някоя от рисковите системни групи като пациенти с диабет, хронични бъбречни заболявания, сърдечно-съдови заболявания, HIV инфекция.

Обсъждане по задача 3. Да се оцени генната експресия на основни проинфламаторни цитокини (интерлевкин 6 (IL-6) и туморнекротизиращ фактор - алфа (TNF- α)) при тежък хроничен пародонтит.

Вроденият и придобит имунитет играят без съмнение ключова роля както в прогресията, така и в ремисията на пародонталното заболяване (19,19а,21,42).

Напредъкът в последните десетилетия в разгадаването на характеристиките на отговора на организма безспорно доведе до по-добро познание на механизмите на прогресия на гингивалното възпаление в деструкция на поддържащи структури. Съвременните усилия на изследователите се фокусират върху откриване на диагностични подходи, целящи ранна оценка на деструктивния отговор на организма и в резултат установяване на терапевтични стратегии за контрол.

Макроорганизъм-микробна хомеостаза

Отдавна се знае, че пародонталните заболявания възникват при нарушаване на хомеостазата или баланса между наличната бактериална флора и макроорганизма.

Според Glickman още през 1958г. оралните бактерии паразитират в човешкия организъм, а пародонталното заболяване се явява следствие на много фактори, които водят до нарушено равновесие (59). Доста след това, през 1986г. Listgarten изразява мнението, че по съществото си пародонталните заболявания са с бактериална етиология, но клиничните изяви могат да се модулират на индивидуален отговор на организма (98). Едва през 2010г. Darveau обсъжда, че пародонтитите могат да са замесени в разнообразни нарушения на хомеостазата на организма, изразени в пародонталните тъкани и предполага обръщането на научните търсения в посока на изучаването на това как бактериалната модулация на цитокинната експресия на организма може да доведе до деструктивния тип възпаление (42).

Учените от години се фокусират върху регулаторната роля на инфламаторните молекули в патогенезата на пародонталните заболявания, разглеждайки я в двете посоки - деструктивна и протективна (7,21,47,158a,164a,166a,167).

Като резултат от матурацията на биофилма, патогенните бактерии в пародонталните джобове освобождават редица вирулентни фактори, антигени или други продукти, които преодоляват защитните механизми на организма. Това причинява клетъчни и тъканни разстройства на базата на нарушаване на инфламаторния регулаторен механизъм, изразено чрез функцията на неутрофилите, моноцитите/ макрофагите, дендритни клетки, Т-клетки, В-клетки. Фагоцитиращите клетки имат сравнително къс живот и това в комбинация с персистиращия бактериален товар, усилената продукция на проинфламаторни медиатори (вкл. интерлевкини, тумор-некротизиращ фактор и др.) на фона на едно хронично възпаление довежда до промени в придобития имунен отговор. При една напреднала пародонтална лезия това се изразява в засягане и на алвеоларната кост и продължаваща загуба на колаген. Henderson et al. изследват RANKL, интерлевкин-1, интерлевкин-6, тумор-некротизиращ фактор, простагландин E2 и намират, че тези показатели са сигнификантно асоциирани с костната загуба при пародонталната инфекция. И тук се подчертава нарушението в баланса между остеобластната и остеокластната активности заради освобождаваните бактериални продукти и инфламаторни цитокини (74). Затова в съвременната литература се отделя внимание именно на продуцираните в резултат на локалния възпалителен отговор цитокини като част от нарушената макроорганизъм-микробна хомеостаза. В резултат на бактериалната инфекция кератиноцитите експресират множество цитокини като интерлевкин 1-алфа, интерлевкин 1-бета, тумор-некротизиращ фактор-алфа. В рамките на възпалението гингивалните фибробласти са

стимулирани от цитокините, освобождавани от макрофагите от съединителната тъкан, да синтезират самите те цитокини. По този механизъм и интерлевкин 1-бета и тумор-некротизиращ фактор-алфа действат стимулиращо на експресията и освобождаването на интерлевкин-6.

Според заключението на Geivellis et al. интерлевкин-6 е проинфламаторен цитокин, асоцииран с пародонталните деструктивни промени в тъканите и се предлага за един вид „биомаркер” за оценка на прогресията на пародонтита (58).

Локалните нива на цитокините изглежда да са в зависимост от микробиотата, асоциирана с пародонтит (85a). Има обаче недостатъчно проучвания относно промените в нивата на цитокините във връзка с общия бактериален товар и композиция на субгингивалния биофилм. Teles et al. изследват *in vivo* връзките между състава на субгингивалната зъбна плака и нивата на осем цитокини в кревикуларната течност (между които и IL-6 и TNF- α) при пародонтално здрави индивиди и при пациенти с генерализиран агресивен пародонтит. Те намират, че цитокините профили при здрави индивиди са предимно хомогенни и повече от 50% от всички цитокини представлява интерлевкин-10. Групата на пациентите с генерализиран агресивен пародонтит се характеризира с разнообразна находка при различните микробни проби. При тази група са установени статистически значими по-високи нива на 6 от 40 изследвани вида патогенни бактерии, между които са и изследваните от нас: *P. gingivalis* и *T. denticola*.

Резултатите на Teles et al. са демонстративни за повишената експресия на IL-13, IL-6 и IL-1b ($p < 0.001$) при агресивен пародонтит. Авторите заключават, че различните субгингивални бактериални профили се отличават с различна експресия на цитокините в гингивалната кревикуларна течност (169).

Като резултат от прегледа на литературата бихме могли да обобщим, че регулирането на нивата на цитокините най-вероятно се дирижира от присъстващата микрофлора при пародонтит, но в проведените до този момент изследвания са показани твърде ограничени данни по отношение на промените в нивата на цитокините във връзка с общата маса и състав на субгингивалния биофилм (12,16). Има данни, че субгингивалния биофилм може да се представлява със значителни вариации в микробния си състав (92). Освен това проучвания върху субгингивалната бактериална находка при пародонтит показват, че близки пародонтални места, дори около един и същи зъб, могат да се различават значително по нива и пропорции на колонизиращите бактериални видове (156). В пародонталната литература за сега е малко оценено въздействието на това микробно разнообразие върху богатата с освободени цитокини

среда в съседните пародонтални тъкани. В тази връзка Teles et al. изказват хипотезата, че при пародонталните заболявания съществува голямо разнообразие в състава на субгингивалната микрофлора и че това многообразие се придружава и от голямо разнообразие в профилите на експресираните цитокини в сравнение със здравия пародонт (168).

Една от целите, които си поставихме в нашето изследване, беше и да проучим евентуалните асоциации между състава на субгингивалния биофилм (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. Denticola*) и нивата на смятани за едни от най-значимите цитокини - **IL-6** и **TNF- α** , освободени в прилежащите гингивални тъкани. В нашето изследване открихме, че количеството на пародонталния патоген *P. gingivalis* в пародонтални джобове с дълбочина 4-6 мм и общия брой бактерии в тези джобове корелират с промяната на генната експресия на **IL-6**, както и, че количеството на пародонталния патоген *T. denticola* в същите джобове корелира с генната експресия и степента на промяна на генната експресия на **TNF- α** . Анализът на основни инфламаторни цитокини в гингивата на пациенти с хроничен пародонтит показва, че:

- Промяната в генната експресия на **IL-6** в гингивата на пациенти с хроничен пародонтит корелира с количеството на пародонталния патоген *P. gingivalis* в джобовете с дълбочина 4-6мм (PD 4-6 мм), както и с общия брой бактерии в тези джобове.
- Генната експресия и степента на промяна на генната експресия на **TNF- α** при хроничен пародонтит корелира с количеството на *T. denticola* при джобовете с дълбочина 4-6мм (PD 4-6 мм).

Увеличените нива на генна експресия на изследваните цитокини в съседство с по-дълбоките пародонтални джобове ние свързваме не само с системната им продукция в отговор на пародонталната инфекция, но и с локално продуцираните възпалителни медиатори и цитокини. Нашите резултати потвърждават разсъжденията на автори, които доказват, че в lamina propria, прилежаща на епитела на пародонталния джоб, както и в непосредствена близост до възпалената гингива, се откриват **IL-6** – съдържащи клетки (40,46).

Резултатите от изследването демонстрират значими разлики в генната експресия на **TNF** (dCt 4-6 мм) при двата пола. Данните показват и статистическа достоверност на разликите в генната експресия на **TNF** при пациентите с места с различна тежест на пародонтита. При жените и пациентите с умерена тежест на заболяване (загуба на аташман, дълбочина на джоба при сондиране, костна загуба) dCt се увеличава (P-

коэффициент < 0.07). Получените резултати насочват към това, че очакваме повишени нива на цитокините в гингивата при пациентите от мъжки пол и с тежък хроничен пародонтит. Може да се направи положителна асоциация на повишените стойности на клиничните параметри: загуба на аташман и дълбочина на джоба при сондиране, а също и на костната загуба, с повишени нива на изследваните цитокини в гингивата. Тези данни биха могли да обяснят един по-лош отговор към провежданата нехирургична терапия и до необходимост от обсъждане на допълнителна хирургична и/или системна антимикуробна и/или системна имуномодулираща терапия.

При изследването установихме статистическа значимост между кървенето при сондиране и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-малката дълбочина: $PD > 6\text{mm}$ спрямо $PD < 4\text{mm}$ – за интерлевкин-6; $PD > 6\text{mm}$ спрямо $PD < 4\text{mm}$ и $PD 4-6\text{mm}$ спрямо $PD < 4\text{mm}$ – за TNF ($R=0.8$). От получените резултати можем да заключим, че пародонталното заболяване води до повишаване на генната експресия на изследваните цитокини в гингивата. Тази находка е в тясна зависимост от тежестта на пародонталното възпаление, изразена чрез кървенето при сондиране и дълбочината на пародонталните джобове. Следователно тези клинични параметри следва да се вземат предвид с висока стойност при диагнозата и лечението на тежките пародонтити.

Установена беше също и статистическа значимост между костната загуба и промяната в генните експресии от пробите при по-голяма дълбочина на джоба при сондиране спрямо по-плитките пародонтални джобове: 1) $PD > 6\text{mm}$ спрямо $PD < 4\text{mm}$ и 2) $PD > 6\text{mm}$ спрямо $PD 4-6\text{mm}$ за TNF ($R=0.6$). На таблица 28 са показани коефициентите на значимост ($R=0.8$) на разликите в генната експресия на изследваните инфламаторни фактори във връзка с различната дълбочина на джоба при сондиране (тежестта на пародонтита). Установени са статистически достоверни корелации между степента на генна експресия на интерлевкин 6 (4-6мм) и степените на промяна на генната експресия на TNF в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране – от дълбоките към плитките места. Установени са също статистически достоверни корелации между степента на генна експресия на TNF ($>6\text{mm}$) и (4-6мм), и степените на промяна на генната експресия на интерлевкин 6 в зависимост от дълбочината на джоба при сондиране – от дълбоките към плитките места. От таблицата се вижда установената положителна корелация между степените на промяна на нивата на генна експресия на

изследваните интерлевкини в дълбоките, средно-дълбоките и плитките пародонтални места.

Проучването показва връзка на генната експресия на IL6 при местата с умерена дълбочина (PD 4–6 мм) с възрастта на пациентите като dSt на изследвания ген нараства с увеличаване на възрастта ($R = 0.7$).

В реферираната литература се срещат предимно данни, които са следствие от проучваната експресия на дадени инфламаторни маркери под влиянието на конкретни вирулентни фактори на определени микроорганизми (127,167). В този смисъл редица автори установяват такава «причинно-следствена» връзка. Оскъдни са обаче данните за потенциалното участие на разгледаните биомаркери в патогенезата на пародонталните заболявания, отнесено към факта, че невинаги наличната бактериална флора предизвиква толкова усилена експресия, както и, че не се предизвиква истински специфичен имунен отговор. Това значи, че на практика не можем да очакваме като отговор на присъствието на определен бактериен експресията на определен цитокин. Вероятно изглежда на този етап на познанието тълкуването на Dixon et al., че имунната система е в състояние да разпознае някои бактериални видове като неопасни за здравето и да избере да не активира деструктивния тип отговор и по този начин да се позволи колонизирането на макроорганизъм-съвместимите видове (45).

Установените корелации в това проучване имат генерална стойност при определяне на значимостта на определени фактори (възраст, пол, тютюнопушене) като рискови фактори на хроничния пародонтит. Рисковите фактори по определение са фактори, които увеличават вероятността от заболяемост. Присъствието на бактериална плака е предпоставка за иницирането на пародонталното заболяване. Литературните данни показват, че преваленцията и тежестта на пародонтита нарастват с възрастта. Полът също би могъл да оказва влияние върху тежестта на пародонтите – мъжкият пол се свързва с по-голяма загуба на аташман. При пародонтит фактори като пол, възраст, социално-икономически, генетични (рисковите детерминанти) могат да играят съществена роля при определяне на терапевтичния подход и план, докато други допълнителни фактори като тютюнопушене, стрес, диабет могат да влияят върху отговора към пародонталната терапия.

Оценката на рисковите фактори би позволила по-точното анализиране на хода на пародонталното заболяване, съобразяване на стратегиите и интервенциите, детерминирането и модифицирането на лечебния план и прогноза.

Обсъждане по задача 4. Да се оцени генният полиморфизъм на интерлевкин-6 (IL-6), тумор некротизиращ фактор - алфа (TNF- α) и лимфотоксин алфа (LT- α) при тежък хроничен пародонтит.

Имунният статус и имунният отговор имат съществено значение за прогресията, обхвата, хода и ремисията на пародонтита (19,21,34a,42,47a).

Трудностите, с които се сблъскват учените, са именно в начина да бъде оценена активността на заболяването на базата на оценка на деструктивния и на протективния имунен отговор. За това е необходимо да се имат предвид както клиничния пародонтален статус, така и присъстващите бактериални агенти, и от трета страна – някои генетични фактори в разгръщането на патогенния имунен отговор. Първото изследване за генен полиморфизъм на цитокини е представено в литературата от Kornman като той открива статистически значима асоциация между тежкия хроничен пародонтит и композитния генотип, по-точно - алел 2 от единичния генен полиморфизъм (single nucleotide polymorphism - SNP) на IL-1A+4845 и IL-1B+3954 локализиран в хромозома 2q13 (89). Това дава основание на други автори да стартират проучвания за ролята на генния полиморфизъм на IL-1 като фактор за тежестта на пародонтита при различни популации и етнически групи (6,18,86,89,110).

В литературата се увеличава информацията за опити за идентифициране на генетични фактори във връзка с пародонтита (71,93b,113,125).

Основно място в тях заемат изследванията за полиморфизъм на интерлевкин 1 бета (IL 1 β), интерлевкин-6 (IL-6) и тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α). Интересът към факторите, обуславящи продукцията на тези цитокини е разбираем тъй като е известна роля на възпалителните фактори в патофизиологията на възпалението (176), включително при пародонталните заболявания (13,32a,48,51,105,138a).

В настоящото проучване ние изследвахме полиморфизма на IL-6 , в позиции -597 и -174, полиморфизма на TNF- α в позиция -308, и полиморфизма на LT- α в позиция -252. При направения анализ на резултатите не се установиха значими различия в разпространението на полиморфизмите на IL-6, TNF- α и LT- α генотипове между контролната група и пациентите с пародонтит. Затова ние интерпретираме получените данни само като даващи оценка за тенденции и преобладаване на даден генотип. Все пак сигнификантна разлика се открива при полиморфизма на LT- α – преваленция на генотип GG при пациентите с тежък пародонтит. По отношение на получените резултати за генните полиморфизми на IL-6 (G-597A) и IL-6 (G-174C)

генотипове – и при двата генотипа при пациентите с тежък пародонтит се установи по-често генотип GG. При пациентите с пародонтит честотата на срещане на генотип GG на TNF- α (G-308A) беше установено да е сигнификантно по-голяма в сравнение със здравите контроли.

Подобно на интерлевкин -1 β , тумор некротизиращият фактор алфа (TNF- α) се смята също за ключов цитокин при развитието на инфламаторния отговор при пародонтит и би могло да се допусне, че е от значение за ефективността на имунния отговор, както и за степента на клиничните резултати в хода на антиинфламаторната терапия на заболяването (76,150).

In vitro проучвания показват индивидуални различия в продукцията на TNF- α при различни възпалителни стимули (11). Автори представят доказателства за значимостта на полиморфизма на TNF- α (по-точно транзицията на гуанин - guanine (G) в аденин - adenine (A) на TNF- α – 308 алел и увеличен риск при заболявания като: улцеративен колит и болестта на Crohn, paediatric-onset inflammatory bowel disease (36) и пародонтит (56). От друга страна автори установяват, че носителството на алел LT- α -252 (по-рано левкотоксин алфа е наричан тумор некротизиращ фактор бета) е било свързано с увеличената продукция на TNF- α както in vitro (112), така и in vivo (73,107).

През 1998г. Kornman и Di Giovine съобщават за увеличена TNF- α -308n2 алелна честота при пациенти от бялата раса с хроничен пародонтит в сравнение с пародонтално здрави индивиди. Освен това авторите установяват и корелация с тежестта на пародонталното заболяване (49). Също така Galbraith et al. (1999) намират TNF- α -308n2 алел за рисков фактор по отношение тежестта на хроничния пародонтит (56,90). През 2003г. Lin et al. демонстрират също повишена честота на TNF- α -308n2 алел при китайски пациенти с хроничен пародонтит (57).

Противоположни са обаче резултатите на Fassmann et al. (2003), които не показват при чешки пациенти TNF- α (-308G/A)-полиморфизъм да е асоцииран с хроничния пародонтит (51).

Във връзка с пародонталните заболявания през последните години са изследвани и други генни полиморфизми като например на IL-6 ((-174) G/C, (-190) C/T и (-597) G/A) (143,144).

Да припомним изследванията на други автори (Raunio et al., 2007г.) във връзка с IL-6-174 генен полиморфизъм GG генотип, където се демонстрира корелация между разпространението на умерения и тежкия пародонтит, изследвания генотип и серумната концентрация на IL-6 (132).

Данните от нашето проучване и от литературата са лимитирани, за да подкрепят силно асоциирането на генния полиморфизъм на TNF- α в позиция -308, на IL-6 в позиция -597 и -174, и на LT- α в позиция -252 с хроничния пародонтит. Но от друга страна оценката в изследването на IL-6 (G-597A) и IL-6 (G-174C), както и на TNF- α (G-308A) полиморфизми показва, че генотип GG се асоциира умерено с хроничния пародонтит при българските пациенти. Като резултат от това бихме могли да предположим, че алел G може да играе важна роля в развитието и прогресията на пародонталното заболяване в изследваната популация.

Някои автори също свързват носителството на GG генотип за силно асоциирано със системната инфекция и възпаление при пародонтит (39). Открихме и литературни данни, които свидетелстват, че хомозиготността по алел G за IL-6 (G-174C) се свързва с по-висока степен на колонизация и развитие на някои от пародонталните патогени - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis* (132). На базата на нашите резултати за изследваните групи пациенти можем да заключим, че генният полиморфизъм може да играе важна роля при определяне на диагнозата, прогнозата и разрешаването на тежкия хроничен пародонтит. Само част от генетично предразположените и/или патоген-експонирани индивиди развиват тежко деструктивно пародонтално заболяване (10-15% е честотата на тежкия хроничен пародонтит). Индивидуалната предразположеност към хронични възпалителни заболявания като хроничния пародонтит може да е свързана както с генетични фактори, така и с фактори от средата. Някои от тях се характеризират с по-слаб, умерен или по-силен ефект. Точността на генетичните тестове в случаите на моногенетични заболявания е голяма. Те имат ниска генетична сложност, но в същото време – висока наследственост, тежест и ранно начало. Това са случаи, в които генетичните тестове са особено полезни (агресивните пародонтити и тежките хронични пародонтити). Други заболявания имат по-голяма гетечна сложност, ниска честота в популацията (<1%) и допълнителни променливи фактори: на средата, поведението, начина на живот. При тях генетичните тестове не биха имали много висока диагностична стойност. Хроничният пародонтит има по-висок риск в популацията, но и много други не-генетични рискови фактори, които при различни условия могат да реагират помежду си или с даден генетичен фактор.

Получените от нас резултати съответстват на получените и от други изследователи и публикувани в литературата (144a). Проучването носи полезна

информация за тенденцията и честотата на разпределение на изследваните генотипове, което би могло да се потвърди в бъдещи по-обхватни проучвания.

Получените резултати за намесата на генетични фактори в патологичния процес при пародонталните заболявания биха могли да придобият клиничен израз, имащ отношение към диагнозата, клиничното протичане, третиране и контрол при пациентите с пародонтит. Необходими са още бъдещи усилия за осъществяване на интегриран анализ с индивидуален диагностичен модел на пациента.

Обсъждане по задача 5. Да се получат данни за влиянието на рисковия фактор тютюнопушене при хроничен пародонтит.

При настоящото изследване се оцени влиянието на тютюнопушенето върху тежестта на пародонтита като за целта са използвани основни клинични параметри като дълбочината на джоба при сондиране и загубата на прикрепване. Получените резултати (таблица 36, стр.99) показват статистически значима връзка на фактора тютюнопушенето с клиничния параметър дълбочина на сондиране (средна ст. (mm)) при ($p=0.063$). При пациентите пушачи се установиха по-високи средни стойности на измерените загуба на аташман и дълбочина при сондиране в сравнение с непушачите.

Епидемиологични проучвания за оценка на потенциалните рискови фактори за пародонталните заболявания са установили увеличен риск от загуба на клиничен аташман в присъствието на някои от тях. Статистическа значимост на риска за пародонтит е установена в много от изследванията за следните фактори: присъствието на увеличени нива на *P. gingivalis*, мъжкия пол, тютюнопушенето, възрастта.

Известно е, че цигареният дим съдържа повече от 4,000 различни токсични субстанции - Heasman et al. изследват възможните странични ефекти на тютюнопушенето и ги разпределят в следните категории:

- свързани със специфични микроорганизми (пародонтопатогени) – между тях два от търсените от нас: *P. gingivalis* и *T. denticola*;
- предизвикване на периферна вазоконстрикция и оттук –ограничен локален защитен отговор към патогенните бактерии, понижено кислородно насищане в пародонталните джобове и благоприятен растеж на анаеробните бактерии;
- увреждане на неутрофилната функция, повлияване дегранулацията на гранулоцитите, отделяне на повишени нива на тумор-некротизиращ

- фактор-алфа, което би могло да има отношение към съединителнотъканната и костната деструкция;
- увеличена експресия на цитокини, главно потвърдена за интерлевкин -1 бета, интерлевкин-6, интерлевкин-8;
 - намалена пролиферативна способност на Т и В лимфоцитите и способност да произвеждат протективни антитела;
 - забавени оздравителни процеси (72).

В съвременната литература широко се дискутират механизмите на модифициране на отговора на организма от определени фактори на обкръжаващата среда. Проучванията на рисковите фактори за пародонтит ясно демонстрират тютюнопушенето като потенциален рисков фактор за пародонтално заболяване. Физиологичните ефекти на тютюнопушенето включват влиянието върху вазоконстрикцията и ревакуларизацията, продукцията на колаген и колагеназа, кислородния транспорт, заздравяването на раните. През 1995г. Schenkein et al. изследват влиянието на тютюнопушенето при пациенти с агресивен пародонтит. Те, подобно и на други изследователи, намират сигнификантни асоциации с увеличените нива на антителата срещу патогените *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*, и също така с тежестта на заболяването (165). Техните наблюдения им дават основание да определят тютюнопушенето като рисков фактор за модифициране на имунния отговор на организма и следователно за повлияване на клиничната експресия на заболяването. Редица други автори също показват, че тютюнопушенето може да повлияе различни аспекти от възпалителния отговор (химиотаксис, фагоцитоза). Според Schenkein 2006 тютюнопушенето може да стимулира продукцията на проинфламаторни цитокини като IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , и по този начин да се намесва чрез увеличаване на костната резорбция и понижаване на костното формиране (15,25,124,147). Според Bergström (2004) могат да се разграничат основни характеристики на тютюнопушене-асоциирано пародонтално заболяване: деструкция на поддържащите зъбите тъкани, загуба на клиничен аташман, костна загуба, формиране на пародонтални джобове, и загуба на зъби (24). Прегледът на литературата през последните 20 години показва доказателства за това, че при пушачите се установява по-голяма костна загуба и загуба на съединително-тъканно прикрепване, по-дълбоки пародонтални джобове и по-значима загуба на зъби от

дентицията в сравнение с непушачите (15,24,25,165). Получените от нас резултати са в съгласие с резултатите и опита на съвременните научни изследвания като подчертават силната връзка на тютюнопушенето като рисков фактор с пародонталните заболявания. Данните показват присъствието на пародонтални места (джобове) с по-голяма дълбочина на сондиране и по-изразена костна загуба при влиянието на фактора тютюнопушене. Резултатите свидетелстват за повишеното присъствие на *Treponema denticola* в субгингивалните проби от дълбоките пародонтални джобове при пушачите в сравнение с непушачите (фигури 43, 44 и 45 и таблица 36 и таблица 38). Някои разлики с получените резултати от други проучвания биха могли да се обяснят чрез различните условия на оценяване. Така например по-слабо присъствие на микроорганизми може да е следствие от по-голям брой на плитките пародонтални места, които са изследвани (пародонтални джобове).

Получените резултати в нашето проучване потвърждават доказателствата от литературата за значимостта на пушенето като рисков фактор за пародонтит от обкръжаващата среда. За клиничната практика е важно пациентите да бъдат информирани, че тютюнопушенето влияе както върху тежестта на пародонтита, така и върху оздравителните възможности на пародонталните тъкани. Установено е, че пушачите имат по-лош отговор спрямо провежданото пародонтално лечение в сравнение с непушачите. Присъствието на фактора пушене влошава прогнозата на заболяването и при по-тежките пародонтити тя може да стигне до съмнителна и безнадеждна. По тази причина отказът от тютюнопушене при леките и умерените пародонтити би могъл да доведе до подобряване и прогнозата на пародонтита (121).

Интерес представляват за нас литературни данни за влиянието върху нивата на IL6 и TNF не само на факторите пол и възраст, но и на тютюнопушенето. Автори са установили повишени серумни нива на IL6 при женския пол в сравнение с мъжкия пол, при пушачите в сравнение с непушачите, а също и при по-възрастните пациенти (132). В нашето проучване се установи, че тютюнопушенето като рисков фактор оказва значимо влияние върху изследваните генни експресии (фигури 46-49 и таблица 39). Присъствието на този фактор се отразява като повишена експресия предимно в местата с по-голяма дълбочина на джоба (PD > 6 мм), и също върху разликите в генните експресии (ddCt) на IL6 и TNF между дълбоките пародонтални джобове (PD > 6 мм) и по-плитките места (PD 4-6 мм). Данните потвърждават значим ефект на пушенето върху тежестта на пародонтита.

Обсъждане по задача 6. Създаване на алгоритъм на диференциран подход в инициалната диагноза на тежкия хроничен пародонтит на базата на бактериалната находка и компоненти на отговора на организма.

Хроничният пародонтит е широко разпространено заболяване в целия свят. Веднъж установена, загубата на поддържащи зъбите структури, свързана с това заболяване, има тенденция да прогресира и без адекватно лечение води до загуба на зъби. Нарастването на познанието за етиологията и механизмите на деструкция на тъканите при пародонтит доведоха до експериментиране на нови подходи както в диагнозата, така и в контрола на заболяването. Днес се знае, че иницирането и прогресията на загубата на пародонтален аташман е свързано с нивата на пародонтопатогените в денталния биофилм и в значителна степен се определя от отговора на организма, детерминиран от генетични характеристики и фактори от средата (19,21,42,155,154). Всички тези фактори са свързани с клиничната експресия на заболяването, с неговата прогресия, отговор към терапията и рецидивите и прогресията.

Съвременната диагноза на пародонтита продължава да е базирана на измервания, показващи наличие на вече загубени пародонтални структури и основната деформация пародонтален джоб. Така традиционното сондиране с определяне на параметрите на джоба и рентгенографски регистрираната загуба на кост е твърде късна диагноза при пародонтит, а използваните критерии са с ограничена диагностична стойност за изхода от терапията, както и в определянето на прогнозата на заболяването (14,19,60). Повечето автори все пак показват консенсус, че пародонталното сондиране и рентгенографията са основни методи в диагнозата и достатъчни при леките и умерени пародонтити. Тежките пародонтити с манифестация на места с повече от две трети от дължината на корена загуба на кост, формиране на ангуларни дефекти и ангажиране на фуркациите и с присъствие на дълбоки пародонтални джобове поставят необходимост от изясняване на причините и механизмите на тежката пародонтална деструкция в опитите за по-добър контрол на заболяването и по-дълго запазване на зъбите на пациента. Високи диагностични изисквания поставят и случаите на лош отговор към терапията.

Изследванията показват, включително тези в настоящия дисертационен труд, че допълнителни подходи с идентификация на известните пародонтопатогени на място-специфично ниво могат да са полезни в разграничаване на различните форми на пародонтит и в планиране на пародонталата терапия при тежки хронични пародонтити.

Получените в настоящите проучвания високи нива за пародонтопатогени от червения и оранжевия комплекс в дълбоките пародонтални джобове на пациенти с голяма загуба на пародонт показват от една страна връзката на нивата на изследваните пародонтопатогени със степента на загубата на тъкани и от друга страна подчертават необходимостта от микробиологичен мониторинг при дълбоки пародонтални места. Резултатите от настоящите проучвания внушават необходимост дълбоки пародонтални джобове с клинични признаци на активност да бъдат изследвани с микробиологични тестове и адекватно третирани. Персистирането на високи нива на пародонтопатогени в такива случаи е индикация за допълнителни антимикробни или хирургични подходи на третиране. Успехът на допълнителната терапия може да бъде потвърден с микробиологичен тест, показващ елиминиране или значителна редукция на пародонтопатогените.

Съвременната концепция за пародонтита силно фокусира върху отговора на организма към микробното дразнене в иницирането и прогресията на заболяването. Познати са в известна степен механизмите на стимулиране на клетките на организма от пародонталните патогени и активиране на тези клетки в посока на деструктивни ефекти върху пародонта. Актуални са проучвания върху фактори на възпалението и на имунния отговор с цел да бъдат по-добре разбрани процесите на деструкция, свързани с фактори от организма. Данните от такива проучвания внушават, че могат да бъдат категоризирани някои инфламаторни цитокини като маркери на деструкцията (20,46,47,91,134). Проучванията в този дисертационен труд показват повишени нива на интерлевкин-6 и тумор некротизиращ фактор алфа в гингивалните тъкани при тежък хроничен пародонтит и особено във връзка с дълбоки пародонтални места, показали присъствие във високи нива на основните пародонтални патогени.

При повечето пациенти с хроничен пародонтит е налице добър отговор към конвенционалното пародонтално лечение. Супра- и субгингивалното инструментирание заедно с качествен плаков контрол е адекватния избор в инициалната терапия на леките и умерените по тежест хронични пародонтити. При някои пациенти обаче отговорът към това лечение е лош независимо от положените усилия и в тези случаи заболяването продължава да прогресира. При някои пациенти се установява рецидивирание на пародонталната деструкция. Търсят се причините както в пропуски в пародонталната поддържаща терапия, така и в повторното свръх-разрастване на вирулентни патогенни бактерии. Установено е, че тези микроорганизми колонизират не само пародонталните джобове, но също и тонзилите, гърба на езика, оралната мукоза. В случаите на тежки

пародонтални лезии е целесъобразно определянето качествено и количествено на патогените, които са основно отговорни за активната пародонтална деструкция. Микробната идентификация цели идентифициране на бактериален рисков профил (МО-микробен профил) на пародонтита с цел подобряване на ефикасността на пародонталното лечение. Това се отнася особено за случаите на тежките пародонтити и пародонтитите с лош отговор към проведената терапия.

Литературните данни внушават значимост на микробиологичната диагноза при някои пародонтални заболявания в различни етапи. Едновременно с това се изтъкват някои ограничения и неразрешени въпроси по повод рутинната употреба на микробиологичния анализ в конвенционалното лечение на пациентите с пародонтит:

- Кога да се изследва?
- Къде да се изследва?
- Как да се изследва?
- Каква е приложимостта на резултатите от изследването в клиничните решения?

Според някои автори има две основни клинични ситуации, в които микробиологичните тестове се препоръчват: първо – в случаите на агресивен пародонтит и второ – в случаите на рефрактерност на пародонталното заболяване. Разглеждат се два основни периода за извършване на микробиологичния анализ: още в инициалната фаза от лечението при агресивния пародонтит, и след завършване на традиционната пародонтална терапия за пациентите, които демонстрират рефрактерност. В поддържащата фаза диагностичните трудности за клиницистите са свързани с възможността да умеят да разпознават и диференцират състоянието на рефрактерност и това, свързано с рецидив на пародонтита.

Следователно микробиологичният анализ не трябва да се приема като част от рутинното начално изследване на пациентите с пародонтит. Добре е той да се отнесе до по-специфични клинични ситуации с цел да се идентифицира микробен профил за таргетна и ефективна антимикуробна терапия. При умерените хронични пародонтити бактериалната находка ще бъде полезна в определянето на рискови места за персистираща прогресия или незадоволителен отговор към терапията.

Данните от литературата сочат, че регулярно провежданата професионална терапия в комбинация с личните орално-хигиенни грижи, би могло да доведе до това,

че композицията на субгингивалната флора при пациентите с хроничен пародонтит да се доближи до тази, установяваща се при пародонтално здравите лица и да се поддържа такава за дълго време. Установяването на подходяща поддържаща програма би осигурило една по-дълговременна стабилност на пародонта.

Получените данни за инфекцията ще послужат за изготвяне на индивидуална програма при хроничен пародонтит при съобразяване на обхвата и тежестта, плаковия контрол и кооперативност на пациента и наличната в дълбоките места инфекция. Смятаме, че анализът на бактериалната находка трябва да бъде ориентиран към пациентите с тежък хроничен пародонтит, агресивен пародонтит, рефрактерен, рецидив, както и при място-специфична активност (прогресия на загубата на аташман и дълбочината на джоба, кървене при сондиране, супурация).

В настоящото изследване получихме данни за значими разлики при разпределението на генотиповете при пациенти с тежък хроничен пародонтит и различна степен на плак-контрол. Установи се, че присъствието на алел G се открива при минималните стойности на HI (=0% свободни от плака повърхности) при: IL6G174C генен полиморфизъм; IL6G597A генен полиморфизъм и LTAA252G генен полиморфизъм. Това ни дава основание да смятаме, че в условията на установена генетична податливост количеството на плаката е фактор с още по-голяма етиологична значимост за заболяването, а качественият плаков контрол би играл важна роля при пародонталната терапия и поддържането на резултата от лечението.

Определянето на присъствието и нивата на бактериите, както и преваленцията на патогенните бактерии в инициалната диагноза може да е част от квалифицирането на тежестта на пародонтита, детерминира терапевтични подходи, в реоценката може да помогне в идентифицирането на рефрактерността и в поддържащата фаза да потвърди стабилност на пародонталния статус или да предиктира или покаже рецидив или прогресия.

Изследването на повече на брой бактериални видове и при по-голям брой индивиди в научните проучвания би било полезно за създаване на критерии за съвместимата с пародонталното здраве микрофлора, и също така и за такава, свързана с патогенезата на пародонтита.

Има необходимост за клиничната практика от ясен протокол на микробиологичен анализ:

- в инициалната диагноза на хроничния пародонтит с цел потвърждаване на диагнозата, определяне на терапевтичните подходи и като база данни за оценка на ефектите от инициалната терапия, както и прогнозата на заболяването;
- при реоценката за оценка на резултатите от нехирургичната терапия и планиране на допълнителна терапия;
- в поддържащата фаза за оценка на прогнозата на заболяването и предикция и диагноза на рецидива и прогресията.

Въз основа на получените в това проучване данни за микробиологичната находка при хроничен пародонтит и установените корелации между присъствието и нивата на основни пародонтопатогени и тежестта на пародонтита (загуба на аташман и дълбоки джобове) препоръчваме микробиологична диагноза при пациенти с тежък хроничен пародонтит да се проведе в инициалната терапия при пациенти с дълбоки пародонтални джобове, където се очаква труден контрол на инфекцията. Следователно важните критерии за необходимост от микробиологичен профил са тежестта на пародонтита и локализирана или генерализирана активност на заболяването. При получените резултати от най-голям интерес е присъствието и нивата на пародонталните патогени от “червения комплекс”: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*”.

На базата на получените резултати в проучванията в дисертационния труд и литературни данни, както и след анализ на значимостта на микробиологичната, биохимична диагноза и идентифициране на генен полиморфизъм предлагаме протокол на мониториране на пациент с тежък хроничен пародонтит при следната последователност на допълнителни тестове:

1. Инициална диагноза

- Клинична диагноза
- Микробиологична диагноза
- Биохимична диагноза
- Идентификация на генен полиморфизъм за повишена продукция на инфламаторни фактори

1.1. Нехирургична антиинфекционна терапия

- Постигане на персонален плак-контрол
- SRP
- Допълнителна антимикробна терапия съобразена с резултатите от допълнителната инициална диагноза

1.2. Реоценка

- Клинична диагноза за реоценка
- Микробиологична диагноза за реоценка
- Биохимична диагноза за реоценка
- Планиране на таргетна антимикробна терапия или хирургична терапия

2. Хирургична антиинфекционна/реконструктивна терапия

- Мекотъканна хирургия за елиминиране на джоба
- Костна хирургия за елиминиране на костни дефекти
- Регенеративна пародонтална терапия
- Реконструкция на алвеоларни места

2.1. Оценка след хирургичната антиинфекционна/реконструктивна терапия

- Клинична диагноза за оценка
- Микробиологична диагноза за оценка
- Биохимична диагноза за оценка
- Планиране на поддържаща терапия

3. Поддържаща пародонтална терапия

- Клинична диагноза за оценка и прогноза
- Микробиологична диагноза за оценка и прогноза
- Биохимична диагноза за оценка и прогноза
- Планиране на допълнителни терапии (антимикробна, модулиране на отговора на организма) в поддържащата терапия

Схема 3. Допълнителна диагноза в терапията на тежък хроничен пародонтит.

В отговор на пародонталната бактериална инфекция организмът реагира с различни механизми. Данните от литературата и от настоящото проучване показват, че в регулаторните процеси участват много ензими и субстанции като: простагландини, цитокини и металопротеинази, манифестирани в пародонталната среда. Едни от най-значимите от тях са: интерлевкин 1, интерлевкин 6 и тумор некротизиращия фактор алфа (39,79,86,88,89,93,104,119,178). Анализът на данните показва, че количеството на тези възпалителни фактори има значение за тежестта на хроничния пародонтит, за отговора към терапията и за прогнозата на заболяването.

Заедно с това е показана и значимостта на генетични фактори, въввлечени в патогенезата на пародонталните заболявания, които могат да са обект на допълнителна диагноза при хроничен пародонтит. Генетичната предиспозиция обаче не може да се разглежда едностранно без да се вземат предвид и допълнителни рискови фактори като: системни заболявания (диабет, HIV), ревматоиден артрит, тютюнопушене, лоша орална хигиена, стрес, възраст, патогенни бактерии, дълбочина на пародонталните джобове.

На базата на резултатите от проучването на експресията на цитокини и присъствието на генен полиморфизъм в дисертационния труд може да се направи внушението, че има необходимост от по-добро дефиниране на случаите, в които се налага изследване за генен полиморфизъм при пациенти с хроничен пародонтит. Това предполага дефиниране на ясни критерии след анализ на клиничните характеристики на пародонтита (87,114,123,178).

При тежките хронични пародонтити допълнителната диагноза е част от **инициалната диагноза**. От **схема 2** става ясно, че при клинична стабилност след нехирургичната терапия допълнителните диагностични методи само могат да потвърдят стабилност на микробиологично и биохимично ниво. В случай на неуспех на конвенционалната терапия обаче допълнителната диагностика е необходима за идентифициране на резидуалната инфекция или настъпила реколонизация.

Допълнителната диагноза служи както за оценка на резултатите (от самостоятелната механична терапия; от механичната терапия, съчетана с допълнителна антимикробна терапия), така и при вземането на решения за бъдещи лечебни процедури. При микробиологични и биохимични показатели за стабилност терапията се оценява като успешна и лечението може да продължи с поддържаща фаза. Намалената експресия на свързаните с имунния отговор и възпалението цитокини може да означава, че пародонталната терапия води до намаляване интензитета на микробното

дразнене, което от своя страна води и до намалена стимулация на възпалението и имунния отговор. Редуцираната експресия на интерлевкини може да се дължи на по-добрата регулация на отговора на организма в резултат на редуцираните нива на вирулентните микроорганизми. Данни от генетичните изследвания могат да потвърдят или отхвърлят генетична предиспозиция за продукция на възпалителни фактори и така да помогнат в планиране на следваща терапия.

На базата на данни за неуспех в разрешаването на присъствието на дълбоки пародонтални места (джоб>6мм или джобове>6мм) и данни за високи нива на субгингивални пародонтопатогени, високи нива на инфламаторни фактори и генен полиморфизъм се препоръчват и допълнителни стратегии при лечението на тежкия хроничен пародонтит – таргетна антиинфекциозна терапия, пародонтална хирургия, модулиране отговора на организма.

Настоящото проучване демонстрира връзката на пародонталната инфекция и тежестта на хроничния пародонтит с експресията на изследваните възпалителни фактори и в зависимост от присъствието на генен полиморфизъм за продукция на някои цитокини.

Данните, получени в проучването, и литературни данни, позволяват създаване на **алгоритъм за допълнителна диагноза**, свързана с изследваните микробиологична находка, възпалителни и генетични фактори като маркери за тежест и прогресия (8,131).

Допълнителната диагноза на базата на микробиологичен анализ и оценка на експресията на инфламаторни фактори и генетична предиспозиция позволява детайлно планиране на пародонталната терапия, коректна оценка на резултатите от активната терапия, както и адекватен контрол в поддържащата фаза.

ИЗВОДИ

Изследванията в настоящия дисертационен труд са фокусирани върху клиничната експресия, микробиологичната находка и биохимични характеристики на хроничния пародонтит с интерес към тежката деструкция на пародонт в някои случаи на манифестация на заболяването.

Целта на проучванията е изследване на връзката между клиничните параметри и специфичността на инфекцията, както и тежестта на загубата на пародонтални структури, свързана с индивидуалния отговор на организма.

Резултатите и изводите от проучванията в дисертационния труд допринасят за допълнително характеризиране на присъствието и нивата на пародонтопатогените в пародонталния джоб при хроничен пародонтит. Характеризирането на микробната находка съответно на тежестта на лезията в проучването е полезно за диагностичния протокол при хроничен пародонтит с диференциране на индикациите и интерпретацията на данните от микробиологичния анализ.

Едновременното характеризиране на локалния отговор към нивата на пародонтопатогените в дълбоките пародонтални джобове в това проучване осигурява данни за значимостта на отговора на организма в деструктивния процес при пародонтит. Оценката на генна експресия на два от значимите в патогенезата на пародонтита цитокини (IL-6 и TNF- α) в гингивата, прилежаща на джобове с голяма дълбочина показва значимостта на бактериалния товар и присъствието на специфични пародонтопатогени във високи нива за предизвикване на деструктивен отговор локално.

Изследванията на генетична предиспозиция при хроничен пародонтит в дисертационния труд с установяване на присъствието на генен полиморфизъм и корелация със степента на загуба на пародонтални структури обосновава необходимост от допълнителни изследвания при пациентите с тежък хроничен пародонтит за детайлна диагноза на заболяването с откриване на значими патогенетични фактори за планиране на адекватен контрол.

Резултатите, получени в проучванията в дисертационния труд и статистическият им анализ позволяват да се направят следните изводи:

1. Резултатите показват, че загубата на аташман и кървенето при сондиране са с важна диагностична стойност във връзка с тежестта на заболяването при тежък хроничен пародонтит.
2. Изследванията демонстрират здравата връзка между пародонталните патогени и пародонтита.
3. Направена е идентификация на представители на *Candida spp.* в субгингивални проби от дълбоки пародонтални джобове.
4. Проучването показва, че генната експресия на IL-6 и TNF- α има значима връзка с възрастта и пола, и корелира значимо с:
 - количеството на пародонталните патогени *P. gingivalis* и *T. Denticola*;
 - основните клинични и рентгенологични параметри;
 - тежестта на пародонтита.
5. Данните показват обвързване на тежестта на пародонтита при присъствие на генен полиморфизъм на IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A), TNF-A (G-308A) и LT-A (A252G), свързан с хомозиготните по алел G индивиди (GG).
6. Изследването показва, че основният генен показател, който би могъл да се квалифицира като предиктор на тежестта на пародонтита е полиморфизма на LT-A (A252G).
7. Резултатите от проучването подкрепят значимостта на тютюнопушенето като рисков фактор за тежкия хроничен пародонтит.

Изводите от проучванията в дисертационния труд са в основата на създаването на протокол на диагноза при хроничния пародонтит, който да включва откриване на допълнителни характеристики на отговора на организма при пациентите с тежък хроничен пародонтит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Независимо от усилията на много изследователи да се разшири и обогати обема на методите за диагноза на пародонталните заболявания, към момента традиционните методи, базирани на основни клинични параметри като кървенето при сондиране, дълбочината на пародонталните джобове при сондиране, загубата на клиничен аташман, и на рентгенографски методи, са най-широко прилаганите при поставянето на пародонталната диагноза. Със сигурност липсата на признаци на гингивално възпаление и наличието на плитки пародонтални джобове имат висока прогнозна стойност за стабилност на статуса. Такива клинични параметри детерминират крайната цел при лечение на пациенти с пародонтит. Някои допълнителни изследвания като например микробиологични и генетични тестове биха били полезни при диагнозата на тежките пародонтити в инициалната диагноза и в мониторирането на пародонтално болни пациенти. Настоящото изследване дава достатъчно доказателства, че определени пародонтопатогени имат здрава връзка с пародонтита. Трябва да се вземе предвид обаче, че пародонталните патогени се открива да присъстват както в активни места на пародонтална деструкция, така и в неактивни места, макар и в по-ниска преваленция и количество. Същите патогенни микроорганизми биха могли да се изолират и от оралната среда на пациенти с гингивит или дори при пародонтално здрави лица и така само идентификацията на някои микроорганизми има ограничена стойност в диагнозата.

Липсата на категорични доказателства за някои потенциални инфекциозни агенти да са във връзка с тежестта на хроничния пародонтит, както в литературата, така и в резултатите от настоящото проучване, ще обоснове допълнителни проучвания за доказването или отхвърлянето на значимостта им при хроничен пародонтит.

В реферираната литература са описани значими различия в преваленцията на пародонталните патогенни бактерии в зависимост от раса, етническа принадлежност, географското положение, както и приложената методология. Някои от изследваните при нашето проучване патогенни микроорганизми са добре познати като асоциирани с прогресията и тежестта на пародонталното заболяване. В България обаче има малко изследвания, фокусирани върху компонентите на субгингивалната микробиота. Липсват и по-категорични данни за изследвани взаимовръзки по отношение на модифициращи рискови фактори като: тютюнопушене, пол, възраст. Още повече не сме открили данни, свързани с комплексно изследване на взаимовръзки между

патогенните микроорганизми, вродения и придобит имуен отговор, ефектите от обкръжаващата среда и предиспониращи генетични фактори в нашата страна. В нашето проучване се интересувахме и установихме значими взаимовръзки между редица показатели на пародонтита, в това число и клинични и параклинични. По своята същност и в такъв обем това изследване е първо по рода си за България.

Резултатите от настоящото изследване демонстрират хроничния пародонтит като заболяване, основно свързано с нивата на пародонтопатогените субгингивално. От друга страна данните за оценката на отговора на тъканите към бактериалния товар и установената корелация на нивата на експресия на основни проинфламаторни фактори в проучването внушават значима стойност на оценката на тези фактори в определяне на диагнозата на индивиди с хроничен пародонтит. Настоящото изследване значимо обогатява литературните данни за популацията като оценява както детекцията на пародонтопатогените (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) в пародонталните джобове с различни дълбочини (до 4мм, 4-6мм и над 6мм), така и генната експресия на два от значимите в патогенезата на пародонтита цитокини (IL-6 и TNF- α) в гингивалните тъкани. Освен това са получени данни за генния полиморфизъм на таргетни цитокини (TNF-A (G-308A), IL-6 (G-174C), IL-6 (G-597A) и LT-A (A+252G). Данните от литературата са твърде малко в търсенето на по-тесни взаимовръзки между нивата на експресирания цитокини, състава на субгингивалната дентална плака, съпоставимо освен това с дълбочината на джоба и с тежестта на пародонталното заболяване. Не намерихме данни да е направено подобно изследване в България.

Проучвания върху значимостта на генетичните фактори за хроничния пародонтит в реферираната литература не дават ясен отговор за значимостта и механизмите на влияние на присъствието на полиморфизъм за инфламаторни цитокини върху експресията на хроничния пародонтит. В направеното от нас изследване честотата на генния полиморфизъм на LT-A (A252G) беше установено да се увеличава при пациентите с тежък хроничен пародонтит. Противоречивите засега данни от литературата дават основание да се предприемат изследвания върху генни полиморфизми на важни цитокини, за които се знае, че са въввлечени в протективно-деструктивния имуен отговор при пародонталните заболявания.

Получените резултати при настоящото проучване предизвикват с необходимост от по-широко разгръщане на проблема, сериозна дискусия и са повод за още по-голям интерес в бъдеще.

Приноси във връзка с дисертационния труд

Приноси с оригинален характер, касаещи българска популация:

1. Проучването предоставя допълнителни данни, отнесени до детекцията на пародонтопатогените (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) в пародонталните джобове с различни дълбочини (до 4мм, 4-6мм и над 6мм) при пациенти с хроничен пародонтит.
2. Изследването показва повишена продукция на IL-6 и TNF- α в гингивалните тъкани при пациенти с хроничен пародонтит.
3. Направена е оценка на взаимовръзката между генната експресия на IL6 и TNF от една страна и фактори на пациента - възраст и пол.
4. Установена е взаимовръзка между нивата на пародонтопатогените и генната експресия на два от значимите в патогенезата на пародонтита цитокини (IL-6 и TNF- α).
5. Значими различия се установяват относно генната експресия (изразена като dCt) на IL6 между пробите, взети от изследваните плитки джобове (≤ 4 мм) и дълбоките места (> 6 мм), както за TNF при местата с умерена и голяма дълбочина (4 – 6 мм / > 6 мм) (**p<0.06**).
6. Установени са значими взаимовръзки между генната експресия на IL-6 и TNF- α и показателите кървене при сондиране и костна загуба (**p<0.06**).
7. Установено е, че присъствието на рисковия фактор тютюнопушене е свързано с по-високи стойности на изследваните параметри (дълбочина на джоба при сондиране и загуба на прикрепване) и различия в генната експресия на IL-6 и TNF α .
8. Данните от изследването на генен полиморфизъм на **IL-6 174C**, **IL-6 -597** и **TNF-A 308** показват асоцииране на генотип GG (хомозиготните по алел G – индивиди) с хроничния пародонтит при изследваната група.
9. За предикция на **тежестта на пародонтита** може да се използват данните за генния полиморфизъм на **LT-A (A252G)** (**p=0.02**).

Приноси с потвърдителен характер:

1. Резултатите от настоящото изследване потвърждават характера на умерения и хроничен пародонтит като заболяване, основно свързано с нивата на пародонтопатогените субгингивално.
2. Потвърждава се здравата връзка на микроорганизмите от червения и оранжевия комплекс с етиологията и патогенезата на хроничния пародонтит.
3. Установената статистически достоверна зависимост на загубата на аташман (CALcp) от разпространението на параметъра BoP (**p=0.002**) потвърждава данни от други изследвания в литературата за това, че кървенето при сондиране има диагностична стойност в определяне на рисковия профил на пациентите с хроничен пародонтит.
4. Статистически достоверните данни (**p=0.001**) за зависимост на костната загуба от BoP (разпространение на кървящите места) потвърждават значимостта на процента на кървящите места за тежестта на пародонтита, изразена и чрез загубата на кост.
5. Получените данни потвърждават значимостта на изследваните цитокини във връзка с тежестта на хроничния пародонтит.

Приноси с практично-приложен характер:

1. Приложен е алгоритъм за диференциран подход на допълнителна диагноза в мониторирането на тежък хроничен пародонтит с данни за бактериалната находка, възпалителни медиатори и генетични фактори.

Списък на публикациите, участията в научни конгреси и проекти във връзка с дисертационния труд

1. Научни публикации

- **Хр. Попова, В. Досева, Вл. Панов.** Микробиологичен анализ при диагностика и мониторинг на пародонталните заболявания - PET тест. II-ри Научен Конгрес на БЗС – СК, гр. София, 13-14 октомври 2012г. Сборник публикации. Стр. 37-39.
- **Chr. Popova, V. Dosseva-Panova, Vl. Panov.** Clinical and microbiological data in patients with chronic periodontitis. Journal of IMAB, 2013, vol.19, issue 4, p.313-316.
- **Chr. Popova, A. Kisselova-Janeva, V. Dosseva-Panova, Vl. Panov.** Subgingival microbiota in severe chronic periodontitis. Journal of IMAB, 2014, vol.20, issue 3, p 554-557. Публикация
- **Досева-Панова, Хр. Попова, А. Киселова-Янева, Вл. Панов.** Идентификация на *Candida spp.* при пациенти с хроничен пародонтит. III-ри Научен Конгрес на БЗС – СК, гр. София, 23-24 ноември 2013г. Сборник публикации. 29-33стр.

2. Доклади на научни конгреси

- **Хр. Попова, В. Досева, Вл. Панов.** Микробиологичен анализ при диагностика и мониторинг на пародонталните заболявания - PET тест. II-ри Научен Конгрес на БЗС – СК, гр. София, 13-14 октомври 2012г. Постер
- **В. Досева-Панова, Хр. Попова, А. Киселова-Янева, Вл. Панов.** Идентификация на *Candida spp.* при пациенти с хрониче пародонтит.. III-ри Научен Конгрес на БЗС – Столична колегия, гр. София, 23-24 ноември 2013г. Постер
- **V. Dosseva-Panova, A. Mlachkova, Chr. Popova, M. Kicheva.** Evaluation of interleukin-6, Lymphotoxin-alpha and TNF- α gene polymorphisms in chronic periodontitis. 25-th Jubilee Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB)14 - 17 May 2015, Varna, Bulgaria, Poster

3. Проекти

1. Субгингивален микробиологичен профил във връзка с активността на деструкцията (експресия на IL-6 и TNF- α) при хроничен пародонтит Проект № 11, финансиран от Медицински университет - София, Грант, Договор № 1, от 17.07.2012г. Научният отчет е приет с **Отлична** оценка по скалата на СМН. Присъдена е **наградата "Signum laudis pro scientiae meritis"** за най-успешна научна разработка в научна област Дентална медицина, финансирана от Медицински университет – София чрез конкурс „Грант” през периода 2012-2013г.
2. Идентификация на *Candida spp.* и суспектни пародонтални патогени при пациенти с тежък хроничен пародонтит - София, Грант, Проект №8, Договор № 13/2013 г. Научният отчет е приет с **Висока** оценка по скалата на СМН.
3. Присъствие на генен полиморфизъм за основни инфламаторни цитокини (интерлевкин-6 (IL-6) - алел IL-6-174 и G-597A, тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α) – алел -308, и лимфотоксин алфа (LT- α)) във връзка с хроничен пародонтит - София, Грант, Проект №5, Договор №16/2014г. Научният отчет е приет с **Отлична** оценка по скалата на СМН.

КНИГОПИС

1. **Джемилева Т, Чорбаджийска Л, Киселова А.** Микробни изолати от активни пародонтални джобове. Актуална стоматология, 1997, Vol.1,3, 7-10.
2. **Джемилева-Конова Т.** Заболявания на пародонта. Ацер, София.1999г. 367с.
3. **Досева В, Попова Хр.** Микробиологичен мониторинг при пародонталните заболявания. Обзор. Зъболекарски преглед 2008,1;47-56.
4. **Кръстева А.** Общата нестимулирана слюнка като диагностична среда при имуновъзпалителни заболявания и орални неоплазми. Канд.дис., ФДМ-София, 2009г., 212 стр.
5. **Кръстева А, Киселова А, Панов Вл, Гирова Б, Кръстева Адр, Бобева А.** Орални лезии. София, 2011г. Изд И. Сапунджиев ЕООД, 296 стр.
6. **Мльчкова А, Попова Хр, Кичева М.** Тежест на хроничния пародонтит във връзка с IL-1 β ген полиморфизъм. Проблеми на денталната медицина Том 37 2011/1, стр. 6-14.
7. **Попова Хр, Мльчкова А, Кичева М.** Tag Man RT-PCR метод за установяване нивата на IL-1B и PGE2 в гингивата при пациенти с хроничен пародонтит.сп. Проблеми на денталната медицина,2009; vol.25,част II, стр.8-15
8. **Попова Хр, Мльчкова А.** Параметри на оздравяването при асистирана с нестероидни противовъзпалителни агенти нехирургична терапия на хроничният пародонтит. сп.Проблеми на денталната медицина, 2010,том.26,частII.
9. **Попова Хр, Коцилков К.** Модулиране на отговора на организма в съвременното третиране на пародонталните заболявания. Зъболекарски преглед 2007;2:152-158.
10. **Разина ИН, Чепуркова ОА, Чеснокова МГ, Недосеко ВБ, Миронов АЮ.** Применение лазерных технологий в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита, ассоциированного с грибами рода *Candida spp.* Стоматология 2012;3:34-36.
11. **Aguillon JC, Escobar A, Ferreira V, Aguirre A, Ferreira L, Molina MC, Ferreira A.** Daily production of human tumor necrosis factor in

- lipopolysaccharide (LPS)-stimulated ex vivo blood culture assays. *European Cytokine Network* 2001;12: 105–110
12. **Albandar JM, Kingman A, Lamster IB.** Crevicular fluid level of beta-glucuronidase in relation to clinical periodontal parameters and putative periodontal pathogens in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 630–639.
 13. **Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA.** Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1245–1249.
 14. **American Academy of Periodontology.** Task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. *J Periodontol* 2015; 86(7):835-838.
 15. **Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper RF, Ellen RP, Tenenbaum HC.** Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke – associated hydrocarbon combined with P.g. lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *J Periodontol* 2004; 75: 939-948.
 16. **Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF.** Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32, 973–983.
 17. **Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL.** Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res* 2009 Feb;44(1):21-27.
 18. **Archana PM, Salman AA, Kumar TS, Saraswathi PK, Panishankar KH, Kumarasamy P.** Association between interleukin-1 gene polymorphism and severity of chronic periodontitis in a south Indian population group. *J Indian Soc Periodontol* 2012 Apr-Jun; 16(2): 174–178. doi: 10.4103/0972-124X.99258 PMID: PMC3459495.
 19. **Armitage GC.** Learned and unlearned concepts in periodontal diagnostics: a 50-year perspective. *Periodontol* 2000 2013; 62:20-36.
 - 19a. **Balaji A, Chandrasekaran SC, Subramaniam D, Fernz AB.** Salivary interleukin-6 – a pioneering marker for correlating diabetes and chronic periodontitis: a comparative study. *Indian J Dent Res* 2017;28:133-137.
 20. **Baqui AA, Meiller TF, Chon JJ, Turng BF, Falkler WA Jr.** Interleukin-6 production by human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor in the presence of lipopolysaccharide of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1998 Jun;13(3):173-80.
21. **Bartold PM, Van Dike TE.** Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol* 2000 2013; 62:203–217.
 22. **Bastos JA, Diniz CG, Bastos MG, Vilela EM, Silva VL, Chaoubah A, Souza-Costa DC, Andrade LC.** Identification of periodontal pathogens and severity of periodontitis in patients with and without chronic kidney disease. *Arch Oral Biol.* 2011 Aug;56(8):804-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.12.006. Epub 2011 Jan 5.
 23. **Beikler T, Schnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemming TF.** Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol* 2006; 77(8):1323-1332.
 - 23a. **Benachinmadi KK, Nagamoti J, Kothiwale S, Metgut SC.** Microbial flora in chronic periodontitis: study at a tertiary health care center from North Karnataka. *J Lab Physicians* 2015;7:49-54.
 24. **Bergström J.** Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology* 2004 Sep;92(1):1-8.
 25. **Bostrom L, Linder LE, Bergstrom J.** Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 352-357.
 26. **Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS.** Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scandinavian J Immunol* 1996;43:456–463.
 27. **Boyanova L, Setchanova L, Gergova G, Kostyanev T, Yordanov D, Kotsilkov K, Mitov I.** Microbiological diagnosis of the severe chronic periodontitis. *Journal of IMAB* 2009;15(Book 2): 89-94.(online issue)
 28. **Brochut PF, Marin I, Baehni P, Mombelli A.** Predictive value of clinical and microbiological parameters for the treatment outcome of scaling and root planning. *J Clin Periodontol* 2005 Jul; 32(7): 695-701.
 29. **Brusca MI, Rosa A, Albaina O, Moragues MD, Verdugo F.** The impact of oral contraceptives on women's periodontal health and the subgingival occurrence

- of aggressive periodontopathogens and *Candida species*. J Periodontol 2010 Jul;81(7):1010-8.
30. **Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos F, Lazera M, Wanke B.** Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. J Periodontol Res 2013;48:428-432. (published online: 8 NOV 2012 DOI: 10.1111/jre.1202).
 31. **Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC.** Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? J Dent Res 1995; 74 (5):1152-1161.
 32. **Charon J, Mouton Ch.** Parodontie medicale. Editions Cahiers de protheses. 2003, p.434.
 - 32a. **Chatzopoulos GS, Doufexi AE, Kouvatsi A.** Clinical response to non-surgical periodontal treatment in patients with interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms. Medicina Oral, Paologia Oral y Cirurgia Bucal 2017;22(4):446-457. Doi:10.4317/medoral.21795.
 33. **Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B.** Persistent colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. J Clin Periodontol 2000;27:897-903.
 34. **Chomarat M, Dubreuil L, Fosse T, Le Golf A, Mouton C, Roques C, Sedalian A, Sixou M.** Bacteriologie pratique des anaerobies bucco-dentaires. Montmorency:2M2, Paris,1999, p.109.
 - 34a. **Cochran DL.** Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol 2008;79:1569-1576.
 35. **Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al.** Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. J Periodontol 2009;80(9):1421-1432.[PMC] [CrossRef]
 36. **Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, De Venuto D, Riegler G, De'Angelis GL, Guagnozzi D, Bascietto C, Miele E, Valvano MR, Bossa F, Annese V.** Polymorphisms of tumor necrosis factor- alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007;44:171-179.

37. **Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC.** Prevalence of *Staphylococcus spp* and *Candida spp* in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam.* 2010;23(1):20-26.
38. **D' Aiuto FD, Nibali L, Mohamed-Ali V, Vallance P, Tonetti MS.** Periodontal therapy: a novel non-drug-induced experimental model to study human inflammation. *Journal of Periodontal Research* 2004a; 39: 294–299.
39. **D' Aiuto FD, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, Tonetti MS.** Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004b; 83: 156–160.
40. **D' Aiuto FD, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS.** Gene polymorphism in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine* 2004c;28:29–34.
41. **Dahlen G.** Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent res* 1993;7(2):163-174.
42. **Darveau RP.** Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 481–490.
43. **Davey M, Costerton J.** Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol* 2000, 2006; 42: 13- 26.
44. **Dietrich T, Kaye EK, Nunn ME, Van Dyke T, Garcia RI.** Gingivitis susceptibility and its relation to periodontitis in men. *J Dent Res* 2006;85:1134–1137.
45. **Dixon, DR, Bainbridge BW, Darveau P.** Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol* 2000 2004; 3: 53–74.
46. **Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL.** Increased presence of interleukin-6 expression in the periodontium. *J Periodontol* 1998;77:1871–1878.
47. **Ebersole JL, Dawson DR 3rd, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, Gonzalez OA.** Periodontal disease immunology: `double indemnity in protecting the host. *Periodontol* 2000 2013;62(1):163–202.
- 47a. **Ebersole JL, Graves CL, Gonzales OA, Dawson D, Morford LA, Huja PE, Hartsfield JK Jr, Huja SS, Pandruvada S, Wallet SM.** Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2016;72:54-75.

48. **Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H.** Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 50-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:1554–1559.
49. **Engelbreton SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB.** GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29(1):48-53.
50. **Farias B, Souza P, Ferreira B, Melo R, Machado F, Gusmao E, Cimoies R.** Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2012:909-916.(ISSN 1517-8382)
51. **Fassmann A, Holla LI, Buckova D, Vasku A, Znojil V, Vanek J.** Polymorphisms in the 1252 (A/G) lymphotoxin alpha and the 308 (A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *Journal of Periodontal Research* 2003;38:394–399.
52. **Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P.** The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102:1369–1376.
53. **Forner L, Neilson CH, Bendtzen K, Larsen T, Holmstrup P.** Increased plasma levels of IL-6 in bacteremic periodontitis patients after scaling. *Journal of Clinical Periodontology* 2006;33: 724–729.
54. **Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K.** Risk of Porphyromonas gingivalis recolonization during the early period of periodontal maintenance in initially severe periodontitis sites. *J Periodontol* 2006;77: 1333-1339.
55. **Gabay G.** Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 2006;8 (Suppl. 2), S3, doi:10.1186/ar1917.
56. **Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP.** Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26:705–709.
57. **Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP.** Tumor necrosis factor-alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998;69:428–433.
58. **Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL.** Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993; 64: 980-983.

59. **Glickman I.** The role of bacteria in the etiology of periodontal disease. Chapter 23. *Clinical Periodontology*, 2nd edn. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1958: 24–334.
- 59a. **Goncalves C, Soares GMS, Faveri M, Perez-Chaparro PJ, Lobao E, Figueiredo LC, Baccelli GT, Feres M.** Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. *J Appl Oral Sci* 2016;24(2):181-186.
60. **Greenstein G.** Contemporary interpretation of probing depth assessments: diagnostic and therapeutic implications. A literature review. *J Periodontol* 1997;68(2):1194-1205.
61. **Guillot JL, Pollock SM. & Johnson R. B.** Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol* 1995;66:667–672.
- 61a. **Gul SS, Griffiths GS, Stafford GP, Al-Zubidi MI, Rawlinson A, Douglas CWI.** Investigation of a novel predictive biomarker profile for the outcome of periodontal treatment. *J Periodontol* 2017, 88: 1135–1144. doi:10.1902/jop.2017.17018.7.
62. **Gursoy UK, Könönen E, Uitto VJ.** Stimulation of epithelial cell matrix metalloproteinase (MMP-2, -9, -13) and interleukin-8 secretion by fusobacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):432-4
63. **Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Socransky SS.** The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24:324-334.
64. **Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS.** Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25: 346-353.
65. **Haffajee AD, Socransky SS.** Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 1994;5:78-111.
66. **Haffajee AD, Socransky SS.** Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm, development and treatment. *Periodontol* 2000 2006;42:7-12.
67. **Haffajee AD, Socransky SS.** Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol* 2000, 2005;38:9–12.
68. **Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J, Kent RL, Okamoto H, Yoneyama T.** Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 1991; 18(2):117-25.

69. **Hamlet SM, Cuillinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, Seymour GJ.** Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population . J Clin Periodontol 2001;28:1163 –1171.
70. **Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S.** Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. Oral Microbiol Immunol 2001 Apr;16(2):113-118.
71. **Hart TC, Kornman KS.** Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:202–215.
72. **Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA.** The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. J Clin Periodontol. 2006 Apr;33(4):241-253.
73. **Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga B, Merk HF, Bloemeke B.** Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha -308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. Critical Care Medicine 2003;31:211–214.
74. **Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M.** Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annu Rev Microbiol 2003; 57; 29-55
75. **Herbert F.Wolf, Edith M.& Klaus H. Rateitschak, Thomas M. Hasselli.** Chapter: Disease Entities and Diagnosis. In: Color atlas of Dental medicine: Periodontology. 3rd edition, 2005 Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart, Germany 189-191p., 532p.
76. **Holmes CL, Russell JA, Walley KR.** Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. Chest 2003;124:1103–1115.
77. **Holt SC, Emersole JL.** *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: a “red complex” a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000 2005 Jun;38(1):72-122. [PubMed] [CrossRef]
78. **Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF.** The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of

- endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , and interleukin 6. *J Periodontol* 2004;75:420–428.
79. **Ishihara K, Hirano T.** IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2002;13:357–368.
 80. **Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M.** *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004;10(2):106-112.
 81. **Javed F, Klingspor L, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engström PE.** Periodontal conditions, oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *BMC Oral Health*. 2009; 9:12.
 82. **Jenkinson Howard F, L. Julia Douglas.** Polymicrobial diseases. Chapter 18 Interactions between *Candida* Species and Bacteria in Mixed Infections (Brogden KA, Guthmiller JM, editors). Washington (DC): ASM Press; 2002. Bookshelf ID: NBK2486 (online available)
 83. **Jepse S, Eberhard J, Fricke D, Hedderich J, Siebert R, Acil Y.** Interleukin-1 gene polymorphisms and experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2003;30:102–106.
 - 83a. **Kakuta E, Nomura Y, Morozumi T, Nakadawa T, Nakamura T, Noguchi K, Yoshimira A, et al.** Assessing the progression of chronic periodontitis using subgingival pathogen levels: a 24-month prospective multicenter cohort study. *BMC Oral Health* 2017;17:46.
 84. **Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC.** Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J. Periodontal Res* 1999;34:25–33.
 85. **Kapoor A, Malhotra R, Grover V, Grover D.** Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dent Res J* 2012 Sep-Oct;9(5):505-515.
 86. **Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, Duff GW.** Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012;83:1407–1419.
 - 86a. **Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV, Giannobile WV.** Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *J Clin Periodontol* 2014; 41:113-120 doi: 10.1111/jcpe.12194.
 87. **Kishimoto T.** Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*. 2006;(Suppl.2):S2, doi:10.1186/1916.

88. **Kishimoto T.** The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989; 74:1–10.
89. **Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW et al.** The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;34:72–7. [PubMed]
90. **Kornman KS, di Giovine FS.** Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):327-38. Review.
91. **Kotsilkov K, Popova Chr, Boyanova L, Setchanova L, Mitov I.** Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2015;29(5):996-1002.
92. **Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ.** Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3944–3955.
93. **Laine Marja L, Loos Bruno G, Crielaard W.** Gene Polymorphisms in Chronic Periodontitis. *International Journal of Dentistry* Volume 2010 Article ID 324719, 1-22 pages.
- 93a. **Lamont RJ, Hajishengallis GM, Jenkinson HF.** Oral microbiology and immunology. 2013 Washinton,2-nd edition,DS,USA,ASM Press,536p.
- 93b. **Lester SR, Bain JL, Serio FG, Johnson RB.** Relationship between the gingival sulcus depth and interleukin-1 isoform concentrations within the adjacent gingival tissue. *J Periodontal Res* 2009;44(3):323-329.
94. **Levy D, Csima A, Birek P, Ellen RP, McCulloch CA.** Impact of microbiological consultation on clinical decision making: a case control study of clinical management of recurrent periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64:1029-1039.
95. **Lin,** 2003 In: **Scapoli C, Mamolini E, Trombelli L.** Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis. *J Clin Periodontal* 2007; 34: 1031–1038.
96. **Lindhe J, Lang NP, Karring T.** *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Fifth edition 2008. Blackwell PUBLISHING, LTD.
97. **Listgarten MA, Loomer PM.** Microbial identification in the management of periodontal diseases: A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003 Dec;8(1):182-192. [PubMed]

98. **Listgarten MA.** Microbiology testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol* 1992; 63: 332-337.
99. **Listgarten MA.** Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 418–42.5
100. **Liu YCG, Lerner U, Teng YTA.** Cytocine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000* 2010;52:163-206.
101. **Loesche WJ, Bretz WA, Lopatin D, Stoll J, Hillenburg KL, Killoy WJ, Drisko CL, Williams R, Weber HP, Clark W, Magnusson I, Walker C, Hujoel PP.** Multi- center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J Periodontol* 1990; 61: 189-196.
102. **Loesche WJ, Lopatin D, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P.** Comparison of the benzoyl-dl-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992;30:427-433.
103. **Loomer PM.** Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2004; 34: 49-56.
104. **Loos BG, John RP, Laine ML.** Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl.6):159–179.
105. **Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, Van der Velden U.** Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000; 71: 1528–1534.
106. **Machado AG, Komiyama EY, Santos SSF, Jorge AOC, Brighenti FL, Koga-Ito CY.** In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci.*2010; 384-387.(online issue)
107. **Majetschak M, Krehmeier U, Ostroverkh L, Blomeke B, Schafer M.** Alterations in leukocyte function following surgical trauma: differentiation of distinct reaction types and association with tumor necrosis factor gene polymorphisms. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12: 296–303.
108. **Mans J, Hendrickson E, Hackett M, Lamont R.** Cellular and bacterial profiles associated with oral epithelium- microbiota interactions. *Periodontol 2000* 2010; 52:207-217.

109. **Masako Iino, Ogawa T, Tamazawa O, Kanda Y, Kamoi K.** Detection of *Candida* Species in Periodontal Pockets. J Jpn Soc Periodontol 2003 45;3:252-259.(online issue)
110. **McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, et al.** Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. J Periodontol. 2000;71:156–63. [PubMed]
111. **McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB.** The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingival and the adjacent sulcular depth. J Periodontol 1998;69:865–871.
112. **Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G. Weiss EH.** Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. J Experimental Medicine 1991;173: 209–219.
113. **Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Califano JV, Burmeister JA, Schenkein HA.** Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. J Periodontol 2000;71:1699–1707.
- 113a. **Min Ki Noh, Min Yang, Soo Hwan Kim, seo ra lee, Ki Ho Park Dong Hwan Kim, Hanna Hyun, Young Guk Park.** Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels on the gingival tissue of patients with periodontitis. Exp Ther Med 2013 Sep;6(3):847-851. Doi: 10.3892/etm.2013.1222.
114. **Mlachkova A, Popova Chr, Kicheva M.** IL-1B gene polymorphisms in conjunction with severity of chronic periodontitis. Probl Dent Med. 2011;37(1):6–14. (in Bulgarian)
115. **Mombelli A, McNabb H, Lang N.** Black- pigmented gram- negative bacteria in periodontal disease. II Scening strategies for detection of Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res 1991; 26: 308- 313.
116. **Morse HR, Olomolaiye OO, Wood NA, Keen LJ, Bidwell JL.** Induced heteroduplex genotyping of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. Cytokine 1999;11:789–795.
117. **Mueller HP.** Periodontology: The Essentials. 1-st edition, Thieme 2004, p.188.
118. **Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA.** Carranza’s Clinical Periodontology, 2006, 10th ed., W.B. Saunders company, Philadelphia, p. 1286.

119. **Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG.** Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol* 2008;35:754–767.
120. **Nishihara T, Koseki T.** Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000 2004; 36: 14–26.
121. **Novak MJ, Novak KF.** Smoking and periodontal disease. p. 251-258. In: Carranza`s clinical peridontology. (Newman MG, Takei HH, Klokkevold P) tenth edition,2006,Elsevier Inc. 1286p.
122. **Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL.** A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *European Journal of Immunogenetics* 1998;25:267.
123. **Page RC.** The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol.* 1998;3:108–120.
124. **Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA.** Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005; 32Suppl.6: 180-195.
125. **Papapanou PN, Neiderud AM, Sandros J, Dahlen G.** Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status.A case-control study. *J Clin Periodontol* 2001;28:389–96. [PubMed]
126. **Paster B, Olsen I, Aas J, Dewhirst F.** The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000, 2006;42:80- 87.
127. **Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC.** Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol* 2000 2010;52:218-237.
128. **Peixoto Iza Teixeira Alves, Janaina de Cássia Orlandi Sardi, Paula Cristina Aníbal, Reginaldo Bruno Gonçalves, José Francisco Höfing.** Evidências científicas da colonização de *Candida spp.* em bolsas periodontais. Scientific evidence of *Candida spp.* colonization in periodontal pockets.RFO, Passo Fundo, 2010. v. 15, n. 2, maio/ago. p. 177-182.(online available)
129. **Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A.** Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *European J Immunol* 1993;23: 224–231.

130. **Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J.** A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *European J ClinInvestig* 1992;22:396–402.
131. **Popova Chr, Mlachkova A.** Effectiveness of additional therapy with NSAID (Aulin) on distribution of shalow and deep periodontal pockets in patients with chronic periodontitis (pilot study). *Journal of IMAB; annual proceeding; 2009; book 4;p.55-57.(online issue).*
132. **Raunio T, Nixdorf M, Knuuttila M, Karttunen R, Vainio O, Tervonen T.** The extent of periodontal disease and the IL-6-174 genotype as determinants of serum IL-6 level. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 1025–1030.
133. **Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, Kalkwarf KL, Allison AC.** Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:225–231.
134. **Renvert S, Wikstrom M, Helmersson M, Dahlen G, Claffey N.** Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol* 1992; 63: 797- 801.
135. **Rescala B, Rosalem W Jr, Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, Gustafsson A, Figueredo CM.** Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol* 2010 Sep;81(9):1308-1316.
136. **Reynaud AH, Nygaard-Østby B, Bøygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P.** Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001 Sep;28(9):860-4.
137. **Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E. et al.** Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol* 1996; 67: 109-115.
138. **Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM.** Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 1997 Dec;76(12):1833-9.
- 138a. **Rodrigues WF, Miguel CB, Mendes NS, Freire Oliveira CJ, Ueira-Vieira C.** Association between pro-inflammatory cytokine interleukin-33 and periodontal disease in elderly. A retrospective study. *J Indian Soc Periodontol* 2017;21:4-9.
139. **Salari MH, Kadkhoda Z.** Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic poeriodontitis. *J Oral Science* 2004;46(3):157-161.

140. **Sanz M, Lau L, Herrerra D, Morillo HM, Silva A.** Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 1034-1047.
141. **Sardi JC, Duque C, Camargo GA, Hofling JF, Gonçalves RB.** Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida spp.* in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis--a pilot study. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct;56(10):1098-105. (Epub 2011 May 6)
142. **Sardi JC, Duque C, Mariano F, Peixot I, Hoflinger J, Goncalves R.** *Candida spp.* in periodontal disease: a brief review. *J Oral Science* 2010, Vol. 52, No. 2, 177-185.(online issue)
143. **Scapoli C, Mamolini E, Trombelli L.** Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 1031–1038.
144. **Scapoli C, Tatakis DN, Mamolini E, Trombelli L.** Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis:interleukin-1 gene cluster polymorphisms. *J Periodontol* 2005 ;76: 49–56.
- 144a. **Scapoli L, Girardi A, PamMieri A, Martinelli M, Cura F, Lauritano D, Pezzetti F, Carinci F.** Interleukin -6 gene polymorphism modulates the risk of periodontal diseases. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29(3S1):111-116.
145. **Schatzle M, Loe H, Burgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP.** Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol* 2003;30: 887–901.
146. **Schatzle M, Loe H, Lang NP, Burgin W, Anerud A, Boysen H.** The clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31:1122–1127.
147. **Schenkein H.** Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000* 2006; 40: 77-93.
- 147a. **Segura Vargas AI, Ilyina A, Caniceros Segura EP, Belmares Silva Y, Gonzales Mendez L.** Etiology and microbiology of periodontal diseases: a review. *Afr J Microbiol Res* 2015;9(48):2300-2306.
148. **Seymour GJ, Gemmell E.** Cytokines in periodontal disease: where to from here?. *Acta Odontol Scand.*2001;59(3):167-73.

149. **Seymour GJ, Gemmell E, Kjeldsen M, Yamazaki K, Nakajima T, Hara K.** Cellular immunity and hypersensitivity as components of periodontal destruction. *Oral Dis.* 1996;2(1):96-101.
150. **Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K.** Association of tumor necrosis factor receptor type 21587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31:463–469.
151. **Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ.** Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res* 2000;79:1864–1869.
152. **Slots J.** Bacterial specificity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 912-917.
153. **Slots J, Listgarten MA.** *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 85-93.
154. **Socransky SS, Haffajee AD.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 2002; 28: 12–55.
155. **Socransky SS, Haffajee AD.** In: Lindhe J, Karring T, Lang NP (Eds). *Clinical periodontology and implant dentistry*, 4th edition, Blackwell Munksgaard, 2003, p. 106-149.
156. **Socransky SS, Haffajee AD.** Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-187.
157. **Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RJ.** Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134–144.
158. **Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A, Hasturk H, van Dyke T, Wang X, Goodson M.** Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *J Clin Periodontol* 2013;40(8):777-780.
- 158a. **Stadler AF, Angst PDM, Arce RM, Gomes SC, Oppermann RV, Susin C.** Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2016; 43: 727–745. doi: 10.1111/jcpe.12557.

159. **Suda, et al.** Periodontal Pathology. In: Clinical Periodontology and Implant Dentistry. (Lindhe J., Lang NP, Karring T.), 2008, Fifth edition. Blackwell Publishing, LTD, P. 422.
160. **Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Ishii K, Muramatsu M, Kamoi K.** Large scale investigation of genomic markers for severe periodontitis. *Odontology* 2004;92:43–47.
161. **Sykora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalova V, Varvarovska J, Pazdiora P, Pozler O, Stozicky F.** Cytokine tumor necrosis factor-alpha a promoter gene polymorphism at position -308 G ! A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:479–487.
162. **Taba MJR, Kinney J, Kim AS, Gianobile WV.** Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005 Jul; 49(3): 551-571.
163. **Takano M, Sugano N, Mochizuki S, Koshi RN, Narukawa TS, Sawamoto Y, Ito K.** Hepatocytes produce tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in response to *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2011;Sep47(5):89-94. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01408.x. [Epub ahead of print]
164. **Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y.** Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003;74:103–110.
- 164a. **Talvan ET, Mohor C, Chisnoiu D, Cristea V, Campian RS.** Expression of interleukin (IL)-1 β , IL-8, IL-10 and IL-13 in chronic adult periodontitis progression. *Arch Med* 2017;9(3):4. doi : 10.21767/1989-5216.1000219.
- 164b. **Taneja N, Kudva PB, Kudva HP.** Interleukin expression as a diagnostic tool in chronic and aggressive periodontitis. *Int J Prev Clin Dent Res* 2017;4(3):184-187.
165. **Tangada SD, Califano JV, Nakashima Ket al.** The effect of smoking on serum IgG2 reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in early onset periodontitis patients. *J Periodontol* 1997; 68: 842-850.
166. **Tatakis DN, Trombelli L.** Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol* 2004;31:229–238.
- 166a. **Tawfig N.** Proinflammatory cytokines and periodontal disease. *J Dent Probl Solut* 2016;3(1):012-017.DOI:10.17352/2394-8418.000026.
167. **Taylor JJ.** Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 2010; 54:160-194.

168. **Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A.** Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000* 2013;62:95–162.
169. **Teles RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles FR, Feres M, Sokransky SS, Haffajee AD.** Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 313-323.
170. **Teles RP, Sekellari D, Teles F, et al.** Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2010; 81(1):89-98.
171. **Tervonen T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R.** Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2007;34:377–383.
- 171a. **Tomás I, Regueira-Iglesias A, López M, Arias-Bujanda N, Novoa L, Balsa-Castro C and Tomás M.** Quantification by qPCR of pathobionts in chronic periodontitis: development of predictive models of disease severity at site-specific level. *Front Microbiol* 2017;8:1443. doi: 10.3389/fmicb.2017.01443.
172. **Tran SD, Rudney DJ, Sparks SB, Hodges SJ.** Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol* 2001;72:1-10.
173. **Trombelli L.** Susceptibility to gingivitis: a way to predict periodontal disease? *Oral Health & Preventive Dentistry* 2004;2 (Suppl. 1):265–269.
174. **Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al.** Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol.* 2008;46:783-93.(online available)
175. **Van Winkelhoff A., Winkel E.** Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000* 2005; 39: 40- 52.
- 175a. **Vargas Segura AI, Ilyina A, Segura Cenicerros EP, Belmares J, Mendez Gonzales L.** Etiology and microbiology of periodontal diseases: a review. *Afr J Microbiol Res* 2015;9(48):2300-2306. Doi: 10.5897/AJMR2015.7609.
176. **Waterer GW, Wunderink RG.** Science review: genetic variability in the systemic inflammatory response. *Critical Care* 2003; 7: 308–314.

177. **Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW.** Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1997;94:3195–3199.
178. **Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH, Hasselli TM.** Genetic risk—Test for IL-1 gene polymorphism. In: *Color atlas of dental medicine: Periodontology.* (Rateitschak KH, Wolf HF, editors) 3rd ed. Stuttgart (Germany): Thieme. 2005. p.189–191.
179. **Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS.** Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000 Sep;27(9):648-657. [PubMed] [CrossRef]
180. **Yang Hui-Wen, Yu-Feng Huang, Ming-Yung Chou.** Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75: 1077-1083.
181. **Yang K, Chang C-J, Hsu P-C et al.** Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodont Res* 2001; 36: 18-24.
182. **Yano-Higuchi K., Takamatsu N., He T., Umeda M., Ishikawa I.** Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 597- 602.
183. **Zambon JJ.** Periodontal disease: Microbial factors. *Ann Periodontol* 1996;1: 879-925.
184. **Zekeridou A, Giannopoulou C, Cancela J, Courvoisier D, Mombelli A.** Effect of initial periodontal therapy on gingival crevicular fluid cytokine profile in subjects with chronic periodontitis. *Clin Exp Dent Res.* 2017;3:62–68. <https://doi.org/10.1002/cre2.61>.